

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929-1930

N° 27

ÉTUDE DE DEUX MICROMÉTHODES
DE
Dosage de l'ion SO^4
APPLICATION AU DOSAGE
DU
SOUFRE SANGUIN

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le Juillet 1930

PAR

Maxime CHATRON

Pharmacien

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Chef de Laboratoire à l'Hôpital Cochin

JURY { MM. GRIMBERT, *Président.*
HERISSEY, *Professeur.*
FLEURY, *Agrégé.*

SAINT-CLOUD

IMPRIMERIE GIRAULT

3, Place de l'Eglise

—
1930

UNIVERSITÉ DE PARIS
FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929-1930

N° 27

ÉTUDE DE DEUX MICROMÉTHODES

DE

Dosage de l'ion SO^4

APPLICATION AU DOSAGE
DU
SOUFRE SANGUIN

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

présentée et soutenue le Juillet 1930

PAR

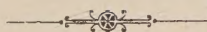
Maxime CHATRON

Pharmacien

Ex-Interne des Hôpitaux de Paris

Chef de Laboratoire à l'Hôpital Cochin

JURY { MM. GRIMBERT, *Président.*
HERISSEY, *Professeur.*
FLEURY, *Agrégé.*



SAINT-CLOUD
IMPRIMERIE GIRAULT

3, Place de l'Eglise

—
1930

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE



ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. ✱, ☿ I.
PERROT, *Assesseur*, O. ✱, ☿ I.
G. DURSENT, *Secrétaire*, ✱, ☿ I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. ✱, ☿ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut, G. O. ✱, ☿ I.	Chimie organique.
PERROT, O. ✱, ☿ I.	Hist. naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, O. ✱, ☿ I.	Zoologie.
GRIMBERT, ✱, ☿ I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. ✱, ☿ I.	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, Membre de l'Institut, O. ✱, ☿ I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, ✱, ☿ I.	Toxicologie.
BOUGAULT, ✱, ☿ I.	Chimie analytique.
GORIS, ✱, ☿ I.	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, ✱, ☿ I.	Botanique générale.
TASSILLY, ✱, ☿ I.	Physique.
DAMIENS, ✱, ☿ I.	Chimie minérale.

Professeur honoraire : M. A. VILLIERS, ✱, ☿ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. SOMMELET, ✱, ☿ I.	Minéralogie.
Marc HONNORAT, ✱, ☿ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LUTZ, ✱, ☿ I.	Cryptogamie.
LAUNOY, O. ✱, ☿ I.	Pharmacodynamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ✱, ☿ I.	MM. PICON, ☿ I.
LUTZ, ✱, ☿ I.	FABRE, ☿ A.
LAUNOY, O. ✱, ☿ I.	MASCRÉ, ☿ I.
HÉRISSEY, O. ✱, ☿ I.	FLEURY, ☿ I.
DELABY, ✱, ☿ A.	BACH, ☿ I.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ✱, ☿ I.	Chimie générale.
FABRE, ☿ A. et FLEURY, ☿ I.	<i>agrégés,</i>
	chargés des travaux de
SOUÈGES, ☿ I.	Chimie analytique.
LEROUX, ☿ I.	Micrographie.
DEVAL, ☿ I.	Physique.
HÉRISSEY, O. ✱, ☿ I., DELABY, ✱, ☿ A., et PICON, ☿ I.	Microbiologie.
	<i>agrégés,</i> chargés des travaux généraux de 4 ^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ☿ I.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. GRIMBERT

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

Hommage respectueux.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551826_0080

À MON REGRETTE MAÎTRE
M. LE DOCTEUR L. FOURNIER
MÉDECIN DES HÔPITAUX
OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A MONSIEUR LE DOCTEUR A. PISSAVY
MÉDECIN DES HÔPITAUX
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

*dont la bienveillance a mis à notre
disposition les moyens de travail.*

A MES PARENTS

A MES AMIS ET COLLÈGUES DE L'INTERNAT

INTRODUCTION

Le dosage du soufre en biologie a une grosse importance et c'est lui notamment qui a permis à J. VALER (90) et à ZOLTAN ASZODI (1) de différencier les hémoglobines, qui, d'après leur identique teneur en fer, pouvaient être supposées toutes semblables.

Quant à notre travail, il trouva son origine dans les déboires que nous donnèrent les méthodes publiées jusqu'alors pour effectuer les dosages du soufre sanguin, dosages que nous avait demandés notre regretté Maître, M. le Docteur FOURNIER.

La classification et l'étude critique des méthodes de dosage des très faibles quantités de soufre à l'état d'ion SO^4 (première partie de ce travail), nous ont paru indispensables avant que d'aborder la mise au point de deux d'entre elles (deuxième partie). Puis nous avons ensuite traité des méthodes de dosage du soufre sanguin et exposé les résultats de nos recherches (troisième partie).

Qu'il nous soit permis, au début de ce travail, d'exprimer nos sentiments de plus sincère gratitude à notre Maître M. le professeur Grimberty, qui a bien voulu accepter la présidence de cette thèse. Nous remercions aussi M. le Professeur Hérissé d'avoir bien voulu faire partie de notre jury. Que M. le Professeur agrégé Fleury trouve ici le témoignage de notre vive reconnaissance pour les conseils éclairés qu'il n'a cessé de nous prodiguer au cours de ce travail.

PLAN DE NOTRE TRAVAIL

PREMIERE PARTIE

	Pages
Exposé des méthodes utilisées pour doser l'ion SO_4	15
CHAPITRE I. — Méthodes au sulfate de baryte	17
CHAPITRE II. — Méthodes à la benzidine	31
CHAPITRE III. — Méthode de Mindalew	45

DEUXIEME PARTIE

Recherches personnelles

CHAPITRE IV. — Etude de la méthode néphélométrique de Denis et M^{lle} Reed. Modifications apportées. Technique proposée	47
CHAPITRE V. — Etude de la méthode benzidinique. Technique proposée	63

TROISIEME PARTIE

Dosage du soufre sanguin

CHAPITRE VI. — Exposé des différentes techniques utilisées jusqu'ici	73
CHAPITRE VII. — Recherches personnelles. Techniques proposées	85
CHAPITRE VIII. — Comparaison de nos résultats avec ceux des auteurs	103
CONCLUSIONS,	

PREMIÈRE PARTIE

METHODES DE DOSAGES DE L'ION SO^4

Quelles que soient les méthodes employées, on¹ cherche toujours à obtenir un sulfate insoluble qui est généralement soit le sulfate de baryte, soit le sulfate de benzidine (1).

Nous classerons donc les méthodes utilisées et publiées, d'après le sulfate insoluble obtenu.

Méthodes utilisant la précipitation de l'ion SO^4 à l'état de sulfate de baryte insoluble

On peut diviser ces méthodes en deux groupes suivant que le précipité est évalué :

1° *Directement* :

- A) Par pesée;
- B) Par néphélémétrie;
- C) Par sédimentation;
- D) Par volumétrie;

2° *Indirectement* :

- E) Par volumétrie;
- F) Par colorimétrie;
- G) Par gazométrie.

(1) Quand parut la méthode de Raschig à la benzidine, Gauvin et Skarzynski (26) songeaient à employer la paraphénylène-diamine dont le sulfate basique est très peu soluble. En outre, J. Biehringer et W. Borsum (9) ont proposé de précipiter l'ion SO^4 à l'état de sulfate d'ortho-toluidine très peu soluble.

**Méthodes utilisant la précipitation de l'ion SO_4
à l'état de sulfate de benzidine insoluble**

Ce sulfate peut être évalué :

Par volumétrie : H) Directement; I) Indirectement;

Par colorimétrie : Directement; Indirectement;

Par dosage de son carbone.

Méthode volumétrique de Mindalew

CHAPITRE PREMIER

METHODES DE DOSAGE DE L'ION SO_4 à l'ETAT de SULFATE de BARYTE INSOLUBLE

a) Dosage du sulfate de baryte par pesée

Nous considérons dans notre travail cette méthode classique comme méthode étalon. Des conditions de précipitation, qui ont été étudiées notamment par : VAN'T KRUYSS (47), F. L. HAHN (28), J. KOLTHOFF et J. VAN CITTERT (44), H. R. JENSEN (38), nous rappelons seulement qu'il faut verser goutte à goutte et en excès la solution de BaCl_2 à 10 % dans la solution légèrement acidulée par HCl , étendue et bouillante de sulfate, en ayant soin d'agiter continuellement.

Dans les liquides biologiques, cette méthode est longue, délicate, peu pratique, vu les faibles doses de SO_4 qu'on a à déterminer. Elle est, en outre, quasi impossible, tant on est parfois limité par la prise d'essai (cas du sang humain).

Seul BROWINSKI (14) emploie ce procédé classique pour doser le soufre dans le sérum de cheval. W. DENIS et Mlle REED (21) s'en servent aussi pour contrôler leur méthode néphélométrique sur le filtrat trichloracétique du sérum, mais il est à remarquer qu'ils effectuent la précipitation de SO_4Ba à froid, suivie de filtration sur creuset de Gooch, et d'après J. KOLTHOFF et J. VAN CITTERT, « la précipitation de SO_4Ba à la température ordinaire donne des résultats toujours trop élevés ».

b) Dosage du sulfate de baryte par néphélométrie

Ces méthodes trouvent leur application dans le cas des solutions de SO_4 très étendues. Elles nécessitent une ou plu-

sieurs solutions de titre connu et voisin de celui de la solution à doser, et c'est par comparaison de l'intensité du trouble dû au sulfate de baryte dans la solution titrée et dans la solution à doser, qu'on déduit la teneur en SO^4 de cette dernière.

Pour que les précipités soient comparables, il faut chercher à les obtenir à grains toujours identiques donnant une solution colloïdale stable. Si on réalise de telles conditions, on peut même mesurer optiquement les troubles obtenus. L'absorption de lumière variant avec l'état de division de la matière en suspension, il faut donc dans toute technique « fixer rigoureusement toutes les conditions de l'expérience susceptibles d'avoir une influence sur la dimension des particules du précipité, ou ce qui est mieux, trouver des conditions de milieu telles, qu'aucune condition physique (mode d'introduction des réactifs, agitation, changement de température), n'intervienne pour modifier la texture du précipité » (*Travaux et publications de l'Institut Prophylactique*, p. 2, fascicule 6, VERNES).

W. COLLINS et M. FOSTER (16) dosent les sulfates dans les eaux par comparaison avec deux solutions étalons, renfermant 5 et 35 mgr de SO^4 par litre.

A 10 centimètres cubes d'eau et de solutions titrées, ils ajoutent un centimètre cube de la solution :

BaCl^2 , $2\text{H}^2\text{O}$	100 gr.
HCl , $\text{D}=1,19$	48 cm^3
Eau q.s.p.	1.000 cm^3

Le précipité obtenu par cette méthode se dépose très vite. S'il peut être apprécié approximativement à l'œil, il ne se prête pas, en tous cas, à une mesure optique précise. (Ce qu'on mesure au photomètre varie d'une seconde à l'autre, tant le précipité se dépose rapidement.)

W. DENIS (20), dans sa première méthode de dosage des sulfates du sang, facilite la formation du précipité colloïdal, par l'addition de chlorure de sodium et nitrate d'ammoniaque à la solution à précipiter.

MAXWELL, BISCHOFF et BATHERWICK (57) rejettent cette méthode pour doser le soufre dans les protéines, car, disent-ils,

l'emploi du chlorure de sodium est néfaste, parce que pouvant faire cristalliser le sulfate de baryte. A leur premier mode de précipitation qui consistait à ajouter, à la prise d'essai faiblement acide :

Solution à 10 % de NO^3Am	4 cm^3
— à 1 % de Cl^-Ba à 0,5 % HCl ..	10 cm^3
Eau distillée q.s.p.....	50 cm^3

ils préfèrent la modification PARR, qui leur a donné des résultats supérieurs. Cette modification consiste à ajouter aux solutions à titrer et étalons faiblement acides, 0 gr. 10 du mélange très bien pulvérisé :



Agiter par intervalles durant quinze minutes et comparer, après avoir amené le volume des deux solutions à 50 cm^3 .

Au lieu d'introduire un mélange pulvérulent qui se dissout difficilement, nous avons employé 1 cm^3 d'une solution à 5 % d'oxalate et 1 cm^3 d'une solution à 5 % de chlorure de baryum. La première a un pH voisin de 7, la deuxième a été réglée par addition d' HCl à pH, voisin de 3. Comme il faut éviter la production d'un précipité d'oxalate de baryte qui ne serait pas toujours identique (si même il l'était, on précipiterait les oxalates de la solution à titrer), le pH final de la solution précipitée doit être inférieur à pH 3. A un tel pH, seul le sulfate de baryte est précipité comme nous le montrons plus loin, et alors il ne reste plus de l'oxalate de potasse dans la solution, mais du chlorure de potassium et de l'oxalate acide de potassium, qui aurait la propriété de rendre plus stable le précipité colloïdal.

Nous avons abandonné cette méthode qui, si elle est supérieure à celle de DENIS, fournit encore un précipité qui se dépose très vite et ne se prête pas à la lecture photométrique.

W. DENIS et Mlle REED (21) ont publié et utilisé une méthode plus avantageuse. Ils emploient comme stabilisant le chlorure de sodium et la gélatine, et ils recommandent de préparer, en même temps, la solution à titrer et la solution étalon. L'influence que peut exercer la présence des autres sels

à aussi été étudiée. De tous, dans les liquides biologiques, les plus gênants sont les phosphates. Le phosphate de baryte qui peut se former est insoluble en milieu légèrement acide, neutre ou alcalin. La solution doit donc être acide, point trop cependant, disent les auteurs, afin de ne pas solubiliser un peu de SO^4Ba . Ils ajoutent que, pour un pH 3 à 3.8, la précipitation du SO^4Ba est optimum et celle du phosphate de baryte nulle. Leur technique, en ce qui concerne l'obtention du tube étalon, est la suivante. Ajouter dans l'ordre et comparer après quinze minutes de repos :

Solution étalon de SO^4K^2 à 0 mgr. 05 ou 0 mgr. 10 de soufre par cm^3	1 cm^3
HCl N/10	25 cm^3
NaOH, 0.6 N.....	1 cm^3
Solution de gélatine à 5 % privée de sulfates.....	1 cm^3
— de Cl^2Ba à 5 %.....	1 cm^3

Les dosages ne doivent être considérés comme exacts que pour des doses de soufre comprises entre 0 mgr. 02, 0 mgr. 16 et 0 mgr. 20 par cm^3 de solution étalon. Au-dessous de 0 mgr. 02, le trouble n'est pas assez abondant pour être observé et au-dessus de 0 mgr. 20, le sulfate de baryte précipite en particules de grosseurs différentes d'une solution colloïdale et peut déposer.

A. BOUTARIC et G. PERREAU (12) ont étudié l'influence exercée par l'addition de colloïdes dits stables tels que la gomme arabique, la dextrine, l'amidon ou la gélatine, sur des suspensions réalisées, en ajoutant à une solution saline un réactif susceptible de produire un fin précipité. Contrairement à l'opinion généralement admise, qui est que ces colloïdes sont des protecteurs, ils concluent que seuls la gomme arabique, et la dextrine, en proportions quelconques arrêtent l'évolution des précipités de ClAg , PO^4Ag^3 , $\text{Mg}(\text{OH})^2$ et retardent celles du précipité de SO^4Ba .

« L'addition d'amidon ou de gélatine accélère l'évolution
 « de tous les précipités étudiés sans exception, ceci toutefois
 « pour les premières minutes, car après un certain temps,
 « quinze à trente minutes au maximum, la solution colloïdale

« se trouve stabilisée », ce qui fait conclure aux auteurs, « à l'emploi de ces colloïdes dans des cas *exceptionnels* pour augmenter la précision des mesures dans le dosage des solutions salines par opacimétrie. »

Les auteurs signalent que le précipité colloïdal de SO_4Ba , en présence de gomme arabique est stabilisé après quinze minutes. Nous montrons plus loin qu'il en est sensiblement de même avec la gélatine.

Nous avons adopté la méthode à la gélatine de DENIS et Mlle REED, légèrement modifiée qui, seule, nous a donné des lectures toujours identiques.

Préparation de la solution de gélatine (d'après Denis et Mlle Reed)

Gélatine très pure du commerce.....	50 gr.
HCl N/100	900 cm ³
BaCl ² à 5 %.....	100 cm ³

Porter au bain-marie bouillant pendant une heure, en agitant de temps en temps. Enlever et refroidir sous l'eau courante. Ajouter 50 cm³ de blanc d'œuf délayés dans quelques centimètres cubes de la solution et mélanger avec soin. Reporter au bain-marie trente minutes jusqu'à ce que le blanc d'œuf coagulé entraîne toute trace de sulfate de baryte colloïdal. Centrifuger à chaud dans des tubes de 30 ou 100 cm³ et décanté le liquide clair dans de petites bouteilles de 30 cm³ à large goulot; les boucher au coton cardé et les stériliser dans l'eau bouillante une heure. Laisser refroidir et conserver à la glacière. La conservation est excellente durant huit mois.

Au lieu de centrifuger (le précipité très léger, collant mal au fond du tube), nous filtrons à chaud sur papier sans cendres, lavé préalablement à l'eau distillée bouillante. Nous avons très souvent observé, dans des flacons stérilisés, soit à trop haute température (102°), soit trop longtemps, la formation, au bout de quelques jours, d'un précipité gris-blanc.

c) Dosage du sulfate de baryte par sédimentation

HAMBURGER (30) précipite la solution chlorhydrique de sulfates par une solution de chlorure de baryum contenant de l'acétone, puis il centrifuge, jusqu'à volume constant du précipité dans des tubes spéciaux capillaires et calibrés (*Chonohématocrite*). Cette méthode qui consiste à lire la hauteur du sédiment obtenu fut appliquée au sang par S. DE BOER (10), mais elle a été abandonnée.

d) Dosage volumétrique direct de l'ion SO_4 sous forme de sulfate de baryte

Robert F. LE GUYON (49) opère par centrifugo-volumétrie. Il arrête l'addition de BaCl_2 , quand après une nouvelle centrifugation, le liquide surnageant ne donne plus de précipité avec une nouvelle goutte de Cl^2Ba .

e) Dosage volumétrique indirect de l'ion SO_4 après précipitation à l'état de sulfate de baryte

R. STREBINGER et L. VON ZORNBORG (87) additionnent la solution de SO_4 à titrer d'une quantité connue et en excès de solution de Cl^2Ba , excès qu'ils titrent par une solution N/4 de SO_4H^2 ou de sulfate alcalin, en présence de 5 gouttes de solution récente à 0,2 % de rhodizonate de sodium comme indicateur. La fin du dosage est indiquée par un virage du rouge au jaune en solution neutre et une décoloration en milieu acide. Les auteurs signalent que le dosage direct est impossible, et que leur méthode ne peut être appliquée à un microdosage.

KLINKE (42) pour doser de très faibles quantités d'ion SO_4 précipite par une solution de chromate de baryum, en milieu acide minéral. Après neutralisation et séparation des préci-

pités, l'ion CrO^4 solubilisé est dosé iodométriquement à l'aide d'une solution N/100 d'hyposulfite de soude. La limite inférieure du soufre dosable est 0 mgr. 01. Cette méthode nécessite la préparation de la solution barytique au moment de l'emploi.

Les autres méthodes emploient la précipitation de l'ion SO^4 par un excès de solution titrée de Cl^2Ba , excès qu'on détermine ensuite volumétriquement. Le procédé (1), qui consiste après avoir séparé le précipité de SO^4Ba à précipiter Cl^2Ba en excès par un volume connu et en excès de CrO^4K^2 , ce dernier excès étant dosé iodométriquement après séparation du précipité de CrO^4Ba , est à rejeter pour le dosage des faibles teneurs en SO^4 , car il oblige à deux filtrations et nécessite l'emploi de trois solutions titrées. La méthode publiée très récemment par Kószegi (46) ne diffère de la précédente que par l'emploi du $\text{Cr}^2\text{O}^7\text{K}^2$ en présence d'acétate alcalin, au lieu du CrO^4K^2 .

ROTH (80) titre l'excès de Cl^2Ba directement par le $\text{Cr}^2\text{O}^7\text{K}^2$ en utilisant comme indicateur la para-diaminodiphénylamine, (9 gr. 10 dissous dans un mélange de 0 gr. 40 acide tartrique pur, 0 gr. 10 acide salicylique, 20 cgr. eau). Cet indicateur est utilisé sur papier-filtre qu'on doit conserver à l'obscurité et il donne une coloration bleue, avec de très faibles traces de $\text{Cr}^2\text{O}^7\text{K}^2$. La titration doit se faire en milieu ammoniacal privé de carbonates.

H. JELLINECK et H. EMS (37) précipitent l'ion SO^4 par un excès de $(\text{NO}^3)^2\text{Ba}$, excès précipité à son tour par une quantité connue et en excès de CrO^4K^2 . Après filtration, ce dernier excès de CrO^4K^2 est dosé directement par addition de $(\text{NO}^3)^2\text{Ba}$ titré jusqu'à disparition de la coloration jaune.

CORDIER (17), BAUZIL (5) précipitent l'excès de Cl^2Ba par le carbonate d'ammoniaque. Les précipités de SO^4Ba et CO^3Ba sont séparés par filtration, puis le CO^3Ba est dissout dans une quantité connue et en excès d'acide chlorhydrique ou azotique, excès qu'on titre ensuite par la soude.

(1) *Précis de Chimie Analytique*, par G. DENIGÈS. Maloine, éd., 1920, p. 607.

Dans les méthodes suivantes, le dosage de l'excès de Cl^2Ba est basé sur les faits ci-après. Dans la réaction type :



Cl^2Ba , ClK , sels de bases fortes et d'acide fort, ne sont pas hydrolysés et ont une réaction neutre. CrO^4K^2 , sel de base forte et d'acide faible, est hydrolysé et a une réaction alcaline, notamment vis-à-vis du rouge de méthyle. Le CrO^4Ba étant très peu soluble, la réaction se fait quantitativement de gauche à droite. H. JELLINECK et J. CZERVINSKI (36) ayant remarqué ces faits, en ont déduit une méthode nouvelle de dosage volumétrique des sulfates. La solution de sulfate est amenée au voisinage de la neutralité (rouge de méthyle encore nettement rose); ils additionnent d'un volume connu et en excès de solution de Cl^2Ba à froid, puis après addition, s'il y a lieu, de nouveau rouge de méthyle; ils titrent l'excès de Cl^2Ba par une solution de CrO^4K^2 . Tant qu'il reste du Cl^2Ba , le liquide reste coloré en rouge, quand tout le Cl^2Ba est précipité à l'état de CrO^4Ba et qu'un excès de CrO^4K^2 est ajouté, le changement de coloration de rouge en jaune se produit.

Les auteurs disent que le titrage doit se faire à froid dans une capsule de porcelaine (on voit mieux le changement de teinte), que le virage est indépendant des quantités de SO^4Ba et CrO^4Ba précipités et que la présence de Cl^2Ca n'a pas d'influence sur le dosage. Ce dosage peut s'effectuer à la lumière artificielle.

Ils emploient deux gouttes de solution alcoolique de rouge de méthyle à 2 % et l'ordre de grandeur de l'erreur est de 0,1 à 0,2 % (1).

(1) Les auteurs partant de considérations tenant au degré d'hydrolyse des sels précipitants en ont déduit une méthode générale de dosage volumétrique, et suivant le produit de solubilité du produit précipité et la constante de l'acide faible du précipitant, ils emploient comme indicateur :

Le Méthylorange qui vire à un pH 3,1 à 4,4.

Le Rouge Méthyle qui vire à un pH, 4,4 à 6.

La Phtaléine qui vire à un pH, 8,3 à 10.

(on s'arrête au virage alcalin).

P. WANDENBULCKE (94) applique cette méthode au dosage rapide des sulfates dans les eaux, mais le bicarbonate de chaux dissout dans les eaux précipitant conjointement avec SO^4Ba par Cl^2Ba et de plus donnant tout de suite le virage avec le rouge de méthyle, il le détruit au préalable. En présence de méthylorange, 250 cm^3 d'eau à doser sont additionnés d'acide chlorhydrique N/10 jusqu'à virage (pH voisin de 4,5). Ajouter en plus 2 gouttes supplémentaires d'acide, puis 10 cm^3 de solution à 2 % de Cl^2Ba . Porter à l'ébullition durant 5 minutes pour chasser le CO^2 . Dans le liquide refroidi, ajouter 1 cm^3 solution à 0,1 pour 1000 de rouge méthyle et verser CrO^4K^2 à 7 0/00 jusqu'à virage.

Pour avoir des résultats corrects, il titre au préalable dans les mêmes conditions de volume et de concentration avec un cm^3 de solution de sulfate, de titre connu, les deux solutions de Cl^2Ba et de CrO^4K^2 . Par cette méthode, il a des résultats rapides, exacts, pour des doses de 5 mgr. à 206 mgr. de soufre pour 100 cm^3 d'eau.

M. HAMUS (31) dosant, lui aussi, l'ion SO^4 dans les eaux, modifie le mode opératoire de F. WANDENBULCKE. Il a en effet remarqué que :

- 1° Si on agite violemment, pendant le titrage, les solutions absorbent du CO^2 atmosphérique, qui nuit à la netteté du virage;
- 2° Si la teneur des eaux en sulfates est inférieure de 28 à 32 mgr. de soufre par litre, le virage de l'indicateur n'est plus net; il faut alors concentrer les eaux très pauvres en sulfates;
- 3° Une teneur très élevée en ClNa (10 gr. par litre) est nuisible, de même que la présence de l'ion nitrique (avec 100 mgr. de NO^3Na par litre, le virage est tellement difficile à voir que les erreurs deviennent de l'ordre de 20 %). Le dosage dans les eaux renfermant quelques traces d'ion NO^3 ou NO^2 est sans erreur appréciable.
- 4° Lorsqu'on a affaire à des eaux de chaudières trop colorées

en jaune par les sels ferriques, il est préférable de les éliminer par agitation de l'eau avec CO^3Ba et filtration, la réaction de l'eau devant être évidemment nettement alcaline à la phtaléine dans ce but.

Cet auteur détermine la dureté temporaire de l'eau sur une première prise d'essai de 100 cm^3 à l'aide d'HCl en présence de méthylorange (le pH doit être de 4,4 à 4,5). Sur une deuxième prise d'essai de 100 cm^3 , il ajoute directement cette quantité voulue d'HCl, puis 20 gouttes de méthylorange alcoolique à 2 %, puis 20 cm^3 d'une solution de Cl^2Ba dont il titre l'excès par une solution correspondant, volume à volume, de CrO^4K^2 jusqu'à teinte jaune persistant au moins trente minutes à froid. Il a fait des dosages comparatifs avec la méthode gravimétrique et il obtient des résultats concordant avec une erreur inférieure à 1 %.

A. A. BRIWUL (13), de son côté, pratiquant la méthode de H. JELLINECK et J. CZERVINSKI à la lumière du jour et à la lumière artificielle, dans une capsule et dans un bécher en verre, emploie toujours un léger excès de CrO^4K^2 , et de ses recherches il conclut :

- 1° L'excès de CrO^4K^2 employé dépend de la petite quantité d'HCl présente pour acidifier légèrement la solution, l'alcalinité de CrO^4K^2 étant vraisemblablement invariable;
- 2° La seule coloration, de par son intensité, ne suffit pas à renseigner sur l'acidité de la solution comme il serait nécessaire pour employer seulement un très petit excès de CrO^4K^2 ;
- 3° Quand on ajoute à une solution très faiblement acide, mais qui donne encore le rose visible avec le rouge de méthyle, une goutte de CrO^4K^2 (le Cl^2Ba étant déjà dans la solution), on obtient une coloration jaune qui, après quelques secondes, se transforme à nouveau en rouge. (Ceci résulte vraisemblablement de ce que la goutte de CrO^4K^2 n'agit pas en totalité immédiatement sur le Cl^2Ba , et, la solution étant très faiblement acide, l'alcalinité de la goutte est suffisante pour colorer en jaune la solution.

L'auteur, pour éviter d'employer un léger excès de CrO^4K^2 , règle le degré d'acidité de sa solution par addition de soude jusqu'à un taux tel que, par addition d'une seule goutte de CrO^4K^2 , la coloration jaune soit obtenue pendant quelques secondes; il recommande d'ajouter l'indicateur et de régler cette acidité seulement après addition de Cl^2Ba . En outre, il introduit une correction nécessaire qu'il détermine comme suit en employant une solution de comparaison contenant les précipités de SO^4Ba et CrO^4Ba : « A 19 cm^3 $907 \text{ N}/10 \text{ SO}^4\text{K}^2$, il « ajoute 25 cm^3 $035 \text{ N}/10 \text{ Cl}^2\text{Ba}$. Théoriquement, pour précipiter l'excès de baryum, il faudrait 5 cm^3 $128 \text{ N}/10 \text{ CrO}^4\text{K}^2$ « ou bien 6 cm^3 51 d'une solution de K à $0,079493$. Par titrage « jusqu'à virage, il emploie 6 cm^3 66 de cette dernière solution. La correction est alors de $(6,66 - 6,51) = 0,15 \text{ cm}^3$ « pour un volume total de 50 cm^3 . » Par l'emploi de la solution de comparaison, l'introduction de la correction et le réglage indiqué de l'acidité de la solution à titrer, l'auteur trouve des résultats excellents (erreur de $+ 0,06 \%$).

La méthode de H. JELLINECK et J. CZERVINSKI doit donc être pratiquée de la façon suivante dans une capsule de porcelaine, en évitant toute agitation :

A la solution de sulfate, ajouter la quantité d'HCl, déterminée dans un essai préalable pour avoir un pH de $4,4$ à $4,5$. Ajouter ensuite un volume connu et en excès de Cl^2Ba , puis deux gouttes de rouge méthyle. Régler ensuite l'acidité du liquide par additions successives de CrO^4K^2 et de NaOH jusqu'à ce qu'une goutte de CrO^4K^2 donne une coloration jaune stable pendant quelques secondes. Ensuite, verser CrO^4K^2 jusqu'à ce que la teinte jaune soit stable pendant quelques minutes, ou mieux, amener à teinte jaune identique à celle d'une solution de comparaison, renfermant sous le même volume les précipités de SO^4Ba et CrO^4Ba en quantités connues et retrancher dans le dosage la correction déterminée dans la solution de comparaison.

(On pourra éviter, si on a peu de liquide à doser, de déterminer la quantité d'HCl à ajouter, en versant dans la solution renfermant une goutte rouge méthyle, HCl jusqu'à teinte rose, etc.,

Cette méthode nous a donné d'excellents résultats sur des solutions pures et de titre connu de SO^4Na^2 .

Identiques dans leur esprit à la méthode de H. JELLINECK et CZERVINSKI, les méthodes suivantes ont été publiées pour doser l'excès de Cl^2Ba :

H. ATKINSON (2) emploie le stéarate de potassium en présence de bleu de bromothymol ou mieux d'indicateur universel B.D.H. (1), la fin de la réaction étant indiquée par un virage du jaune au bleu vert; A. BARHDT (3), le palmitate de potassium en présence de phtaléine (virage à pH 10); E. P. SCHÖCH (84), le carbonate de soude à 90 %, en présence de thymolphtaléine, qui vire au bleu à pH 10,23.

Ces méthodes si elles évitent l'action perturbatrice du CO^2 atmosphérique, présentent l'inconvénient de réaliser la précipitation du SO^4Ba à un pH beaucoup trop élevé, et d'autres sels de baryum peuvent être précipités.

f) Dosage indirect du sulfate de baryte par colorimétrie

De même que KLINKE, KONRAD LANG (48) précipite l'ion SO^4 par un excès de solution de CrO^4Ba en milieu acide minéral. Cet excès, qui n'est soluble qu'en milieu acide minéral, est précipité par addition de $\text{Ca}(\text{OH})^2$. L'ion CrO^4 resté en solution est dosé colorimétriquement par la diphénylcarbazine qui donne une coloration rose due à la formation de diphénylcarbazonne : $\text{C}^6\text{H}_5\text{N}-\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{C}^6\text{H}_5$.

D'après l'auteur, les limites de cette méthode sont données par celles de la solubilité du CrO^4Ba , solubilité sensiblement de même ordre que celle du SO^4Ba qui est, à + 18°, de 3 mgr. 8 par litre d'eau, ce qui correspond à 1 mgr. 5 de SO^4H^2 . L'er-

(1) *Indicateur Universel B.D.H.*

Bleu de Bromophénol à 0,04 %.....	4 parties
Pourpre de Bromocrésol à 0,04 %.....	1 —
Rouge de Méthyle en solution alcoolique à 0,02 %	6 —
Bleu de Bromothymol à 0,04 %.....	4 —

reur est généralement inférieure à 2 % si on consomme 20 à 80 % du chromate utilisé.

L'auteur recommande de préparer comme suit les réactifs employés.

Préparation de CrO^4Ba . — Mélanger à l'ébullition deux solutions de Cl^2Ba M/10 et CrO^4K^2 M/20. Le précipité essoré est lavé plusieurs fois à l'acide acétique cristallisable, jusqu'à ce qu'il ne donne plus de coloration rose appréciable avec le réactif à la diphénylcarbazine. Le produit est séché à 90° . On en pèse 1 gr. 267, qu'on dissout dans 1.000 cm^3 d'eau par addition de 100 cm^3 HCl N (solution N/100 de CrO^4Ba).

Préparation de la diphénylcarbazine. — Chauffer à petite flamme, pendant quarante-cinq minutes, dans un ballon ouvert :

Urée (0,1 m.).....	6 gr.
Phénylhydrazine (0,2 m.).....	26,1

Il y a dégagement d'ammoniaque. Laisser refroidir. Le gâteau cristallisé qui s'est formé dans le matras est pulvérisé, lavé à l'éther pour éliminer la phénylhydrazine en excès. Les cristaux deviennent incolores. On les essore, on les sèche et on les fait recristalliser dans environ 300 cm^3 d'eau bouillante. On obtient ainsi 10 à 15 gr. de substance pure à point de fusion = 164° .

Deux grammes de diphénylcarbazine sont mis en solution dans 10 cm^3 acide acétique cristallisable et on y ajoute 90 cm^3 alcool à 96° .

Technique du dosage. — (Voir p. 80)

g) Dosage indirect du sulfate de baryte par gazométrie

D. D. VAN SLYKE, A. HILLER et K. C. BERTHELSEN (85); dosant les bases totales du sérum sanguin après minéralisation sous forme de sulfates, ont employé la méthode ci-après, qui

leur a donné des résultats concordant avec ceux que donnent les méthodes à la benzidine de FISKE et de STADIE et ROSS, qui seront étudiées plus loin.

Si on additionne une solution de sulfates, d'(IO^3) ^2Ba insoluble, en se mettant dans des conditions déterminées, il y a formation en certaines proportions d'iodates solubles :



On dose ensuite les iodates solubles formés par l'hydrazine dans l'appareil de VAN SLYKE.



Du volume d'azote dégagé, qui est considérable, on déduit la quantité de sulfates. Quoique plus soluble que le sulfate, l'iodate ne l'est pas assez pour que toute la réaction soit complète dans le sens gauche à droite. Quand la réaction entre (IO^3) ^2Ba et les sulfates alcalins est faite à la température ordinaire du laboratoire avec une concentration en SO^4 comprise entre 3 et 15 milliéquivalents par litre et un pH compris entre 3 et 7, et qu'on est seulement en présence de sulfates, la quantité de soufre est donnée par la formule empirique :

$$\begin{aligned} \text{Milliéq. SO}^4 \text{ par litre} &= 0,724 \times (\text{milliMol. N}^2 \text{ libéré par litre}) \\ &+ 1,123 \end{aligned}$$

CHAPITRE II

METHODES DE DOSAGE DE L'ION SO_4 A L'ETAT DE SULFATE DE BENZIDINE INSOLUBLE

Méthodes de dosage des sulfates par la benzidine

Le but cherché, qui est de précipiter tout et rien que le sulfate de benzidine, n'est pas simple à réaliser, comme nous le verrons; aussi, ne doit-on pas être trop surpris si les auteurs diffèrent sensiblement sur les conditions à observer dans la précipitation, notamment en ce qui concerne l'acidité.

Pour permettre un exposé plus clair, nous rappellerons tout d'abord les solubilités de la benzidine et de ses sels.

Solubilités de la benzidine

D'après WURTZ (98), 1 p. se dissout dans 2.450 p. d'eau.

D'après MONIKOWSKI (64), 1 p. se dissout dans 2.700 p. d'eau.

D'après Fritz ULLMANN (25), 1 p. se dissout dans 2.447 p. d'eau à 10°; 1 p. se dissout dans 106,6 p. d'eau à 100°; 1 p. se dissout dans 45 p. d'éther anhydre.

D'après PUCHER et DAHN (1921), 1 p. se dissout dans 13 p. d'alcool absolu à 20-25°.

Facilement soluble dans l'alcool-éther et dans l'acétone. (La solution obtenue est colorée en jaune clair, mais noircit très vite si on la laisse à la lumière.)

Solubilités du chlorure de benzidine

MONIKOWSKI (64) donne les solubilités suivantes :

Solvant	Solubilité en grammes par litre :	
Eau Distillée.....	12,22 dont { 10,87 sel non dissocié 1,35 sel dissocié	Acidité de la liqueur { totale : 0,09534 N du dichl : 0,0846 N
HCl N/100.....	8,534	
HCl N/50.....	4,30	
Acide Acétique N/100	4,94	
Acide Acétique N/50.	3,57	
Alcool à 20°.....	4,78	
Alcool à 45°.....	5,24	
Alcool Ether.....	Assez soluble (La solution se colore en jaune brunâtre caractéristique).	

Nous avons montré (15) qu'il est insoluble dans l'acétone pure, qui le précipite de ses solutions si la teneur finale en acétone est supérieure à 95 % en volumes. (L'hydrolyse de ce précipité acétonique montre qu'on a affaire uniquement à du chlorhydrate et pas du tout à du sulfate, qui aurait pu provenir de la présence de sulfates dans l'acétone. Nous n'avons, d'ailleurs, jamais rencontré d'acétone renfermant de sulfates. La recherche des sulfates dans l'acétone par Cl^2Ba doit évidemment se faire en milieu étendu, car le Cl^2Ba est aussi précipité de ses solutions par l'acétone anhydre.) Il est soluble dans l'acétone à 95% en volumes. Il est précipité de ses solutions par HCl et les chlorures. (La solution saturée de ClNa le précipite.)

Solubilité du sulfate de benzidine

WURTZ (38) indique la solubilité de 1 p. dans 3.030 p. d'eau.

WOLF MULLER (97) indique la solubilité de 1 à 3 p. dans 10.000 p. d'eau.

MONIKOWSKI (64) indique la solubilité de 1 p. dans 12.650 p. d'eau.

Fritz ULMANN (25) écrit qu'il est presque insoluble dans l'eau bouillante et dans l'alcool.

FISKE (24) dit qu'il est insoluble dans l'acétone.

D'après BISSEON et CHRISTIE (1920), la solubilité en grammes par litre dans l'eau est :

à :	0°	25°	50°	80°
de.....	0,049	0,098	0,141	0,290

MONIKOWSKI (64) a étudié sa solubilité dans différents milieux.

Solvants	Eau dist.	HCL N/100	HCL N/50	HCL N/20	HCL N/10	HCL N/5	HCL N/2	HCL N	Alcool à 45°	Alcool à 20°	Alcool éther
solubilité du sulfate de benzidine par litre	5,61	6,4	7	12,6	19	30	54,18	89,36	—	—	Insoluble. Pas de rési- du à l'évapo- ration de la solution saturée à froid, après filtration.
	en cm ³ de sol N/10	0,0791	0,0902	0,0987	0,1776	0,2679	0,4230	0,7639	1,2313	0,040	0,045
	en poids	0,069	0,0785	d'après G. ZIMMERLUND et G. SVANDBERG (101).							

KAHN et LEIBOFF (39) le disent insoluble dans l'alcool à 50°.

Si, de même que l'HCl, les chlorures augmentent sa solubilité dans l'eau, la présence de dichlorhydrate de benzidine la diminue, et ceci résulte de la loi de masse.

$$\frac{\text{ion benzidine du sulfate} \times \text{ion benzidine du dichlorhydrate}}{\text{Sulfate de benzidine}} = K$$

MONIKOWSKI a donc étudié sa solubilité en présence de dichlorhydrate dans l'eau et dans l'eau chlorhydrique. (Cf. p. 34.)

o/o du volume total de solution saturée à froid de dichlorhydrate	Eau distillée		HCl N/100		HCl N/50		HCl N/20		HCl N/10		HCl N/5		HCl N/2		HCl N	
	en cm ³ de sol. N/10	en poids mg	en cm ³ de sol. N/10	en poids mg	en cm ³ de sol. N/10	en poids mg	en cm ³ de sol. N/10	en poids mg	en cm ³ de sol. N/10	en poids mg	en cm ³ de sol. N/10	en poids mg	en cm ³ de sol. N/10	en poids mg	en cm ³ de sol. N/10	en poids mg
0	5,61	79,4	6,4	90,24	7	98,7	12,6	179,66	19	267,9	30	423	54,18	763,94	89,36	1231,3
1	5,61	79,4													»	»
2,5	2,8	39,4													»	»
5	4,26	47,7													»	»
10	4,42	45,8													»	»
15	0,70	9,87													»	»
20	0,60	8,46													»	»
25	0,56	7,89	2,4	33,84	2,6	33,66	7,56	106,6	11,71	165,1	16,5	232,65	27,9	393,4	»	»
35	»	»													»	»
40	»	»													»	»
50	»	»	1,6	22,53	1,75	24,67	3,15	44,41	6,65	93,76	8,85	124,78	13,54	190,9	»	»
75	»	»	1,28	18,03	1,4	19,74	2,52	35,53	3,60	50,76	6,5	91,65	10,83	152,7	»	»

Solubilité du sulfate de benzidine dans l'eau et dans l'eau chlorhydrique en présence de dichlorhydrate de benzidine.

La solubilité du sulfate devient donc minima dans l'eau distillée dès que le volume de la solution, saturée à froid, de dichlorhydrate ajoutée devient les 25 % du volume final, et elle est alors dix fois plus faible que dans l'eau distillée seule. Dans les dosages on aura donc intérêt, quand on précipitera par une telle solution, à en employer un excès. Il est à remarquer que cette action insolubilisante est combattue par la présence et la formation d'HCl et de chlorures, et même annulée dès que le titre de la solution en HCl atteint la normalité.

Solubilités des autres sels de benzidine

Le phosphate est assez soluble dans l'acétone aqueuse. L'oxalate, d'après WURTZ, est assez soluble dans l'eau et dans l'alcool. L'acétate est très soluble dans l'eau distillée et dans l'alcool.

h) Méthodes de dosage direct à la benzidine

Seule, la méthode de G. TESTONI (89) peut mériter ce qualificatif. Il emploie une solution titrée de benzidine en dissolvant 10 grammes de benzidine dans 100 cm³ d'acide acétique cristallisable, puis en complétant à 1.000 cm³. Après vingt-quatre heures de repos, la solution est filtrée et titrée par H²SO⁴ N/10. La solution d'acétate est peu à peu versée dans l'H²SO⁴; la séparation du sulfate de benzidine est immédiate et la fin du titrage peut être évaluée par le procédé à la touche en employant un oxydant tel que PbO² ou S²O⁸K². (Une solution d'acétate de benzidine à 1 p. 200.000 se colore nettement en bleu en quelques secondes par l'addition de quelques gouttes d'une suspension de PbO² dans l'eau.)

Les solutions à doser doivent être acidifiées par l'acide acétique, les acides minéraux influençant la netteté du virage. On peut se servir de bandes de papier buvard plongées dans une suspension de PbO², puis séchées, pour observer la fin du dosage avec le procédé à la touche.

Aussi attrayante que puisse paraître cette méthode, la réac-

tion de l'acétate est trop sensible et trop sujette à erreurs et dans le dosage de très faibles quantités de sulfates, l'erreur relative peut, de ce fait, devenir très importante.

Par méthodes de dosage direct à la benzidine, on comprend celles qui, après séparation du précipité de sulfate de benzidine, tilrent, après hydrolyse, l'acide sulfurique que libère ce sulfate.

Nous allons étudier successivement tous les temps du dosage.

1) Précipitation du sulfate de benzidine

Dans le cas d'une solution ne renfermant que des sulfates, MONIKOWSKI, dans un essai préliminaire, — et c'est le seul ennui de la méthode, — détermine approximativement la quantité v de solution saturée à froid de dichlorhydrate de benzidine nécessaire pour précipiter tous les sulfates. Sur une deuxième prise d'essai identique, il neutralise la solution à la phtaléine et il ajoute ce volume v de réactif benzidinique, plus un excès représentant 75 % du volume *total* du premier essai (solution sulfatée réactif). Si, par exemple, dans son premier essai, il lui a fallu 30 cm³ de solution de dichlorhydrate pour 50 cm³ de solution à doser, il en emploie, pour le dosage : $(50 + 30) \times 75/100 + 30 = 90$ cm³.

Il assure ainsi les meilleures conditions de précipitation : la liqueur étant très riche en chlorure de benzidine et très pauvre en HCl et chlorures, puisque ne renfermant que les chlorures qui peuvent se former dans la réaction de dosage, il n'y a pas de surcharge due au dichlorhydrate, et la plus grande insolubilité de sulfate est réalisée.

Pour assurer une plus grande insolubilité du sulfate de benzidine, et n'avoir aucune surcharge à craindre, R. S. HUBBARD (34) effectue la précipitation à l'aide d'une solution de benzidine base dans l'acétone pure. Dans ce cas, il faut prendre garde à ne pas précipiter de benzidine base, ce qui peut avoir lieu ;

1° Si la teneur finale en acétone est trop faible pour en assurer encore la solubilisation;

2° Si la précipitation n'est pas faite en milieu suffisamment acide, les bases libérées pouvant alors créer une solution finale alcaline.

La plupart des auteurs, depuis RASCHIG, utilisent comme solution précipitante, une solution chlorhydrique de chlorure de benzidine, dont la teneur en HCl est d'ailleurs assez variable. Il est évident que les erreurs de dosage seront d'autant plus importantes que la précipitation se fera en liqueur plus acide. L'acidité de la liqueur précipitée devra donc être bien déterminée, mais certains auteurs ne s'inquiètent pas de régler la réaction initiale de la solution à précipiter; on peut trouver là l'explication des différences d'acidité des liqueurs benzidiniques, toutes n'ayant pas été conçues pour la même application du dosage des sulfates par cette méthode. Quant à la concentration en benzidine, d'après VLASTIMIL et M. MATULA (92), elle ne change rien aux résultats.

BOIVIN (11), pour n'avoir pas à tenir compte de la faible solubilité du sulfate de benzidine, réalise la précipitation dans un milieu préalablement saturé de ce sel. La solution à doser est évaporée à aussi petit volume que possible ou mieux encore à sec. Le résidu est traité par 5 à 10 cm³ de solution chlorhydrique de chlorhydrate de benzidine saturée de sulfate de benzidine.

Pour insolubiliser davantage le précipité, FISKE (24) additionne la liqueur à précipiter d'acétone à 95 % en volumes; MM. A. LESURE et A. DUNEZ (51), « d'acétone pure exempte de soufre »; KAHN et LEIBOFF (39), d'alcool à 95°.

Durée du temps de repos qui suit la précipitation.—Tous les auteurs sont d'accord pour constater que la précipitation est complète après cinq à dix minutes. ROSENHEIM et DRUMMOND (81) ont, en outre, montré qu'une attente d'une heure ne modifie pas les résultats.

2) Séparation du précipité.

La plupart des auteurs utilisent des filtres sans cendres. FISKE a préconisé un filtre de pulpe de papier filtre; Mme ПОРО-

RECKA-LESLEZ, un filtre en verre poreux d'Iéna, que YAMAZAKI (99) utilise, adapté sur l'appareil de FONTES et THIVOLLE pour le dosage du glucose du sang. M. FABRE et nombreux autres auteurs emploient la centrifugation.

3) Lavage du précipité.

MONIKOWSKI a montré que l'eau ne devait pas être employée (100 cm³ eau de lavage dissolvent 0 cm³ 50 à 0 cm³ 56 de la solution N/10 de sulfate de benzidine, soit en poids 7 à 8 mgr.). ROSENHEIM et DRUMMOND lavent le précipité avec une solution saturée de sulfate de benzidine jusqu'à ce que les eaux de lavage ne soient plus acides au rouge Congo. FISKE dit que « outre que ce mode de lavage doit être rejeté en principe, il « donne un précipité en plaquettes très difficilement hydrolysables ». Ce dernier auteur rejette l'emploi de l'eau, qui mouille mal les parois du vase où s'est faite la précipitation (elle forme des gouttes) et il utilise l'acétone à 95 % en volumes. On lave ainsi une plus grande surface avec un plus petit volume, car elle mouille toutes les parois sans faire de gouttes. Il évite, en outre, — et c'est la plus importante de ses considérations, — la formation de flocons difficilement hydrolysables de sulfate de benzidine. BOIVIN, lavant à l'eau chlorhydrique et saturée de sulfate de benzidine puis finalement à l'alcool, obtient d'excellents résultats.

MONIKOWSKI lave à l'alcool-éther qui présente, à notre avis, les mêmes propriétés que l'acétone à 95 %. LEIBOFF (39) a de très bons résultats en lavant à l'alcool à 50°. De même VLASTIMIL et M. MATULA (92) lavent avec de l'alcool dilué (une partie alcool à 96° + 3 parties d'eau), « qui solubilise moins de sulfate et débarrasse mieux du dichlorhydrate adsorbé. »

MM. A. LESURE et A. DUNEZ (52) ont remarqué que l'acétone a une réaction légèrement acide, et ils recommandent de laver une dernière fois avec 1 à 2 cm³ d'eau distillée pour éviter que cette acidité n'intervienne ensuite dans le dosage.

4) Titrage de l'H²SO₄ libéré par hydrolyse du sulfate de benzidine.

L'hydrolyse est réalisée à l'ébullition par de l'eau distillée

amenée au virage rose de la phtaléine par de la soude étendue. L' H^2SO^4 libéré est titré à chaud par la soude N/50. (Les premières gouttes font virer quelques secondes au rouge la phtaléine, puis l'hydrolyse se poursuit très rapidement.)

ROSENHEIM et DRUMMOND emploient une solution de phtaléine plus forte que d'habitude, le papier filtre, d'après eux, en absorbant une quantité assez considérable. FISKE emploie, parce que plus sensible, une solution aqueuse à 5 % de sel monosodique du rouge phénol.

Influence de la présence de différents sels

Influence des nitrates. — D'après VLASTIMIL et M. MATULA (92), « le précipité est plus volumineux, jaunâtre et en flocons « plus gros. Les résultats trouvés sont plus élevés; car, bien « qu'il reste quelques sulfates en solution, la quantité de « chlorures adsorbés est très importante. On réalise une pré- « cipitation maxima des sulfates en précipitant par un grand « excès de benzidine assez diluée et de la sorte, le minimum de « dichlorhydrate est adsorbé. (Les lavages à l'alcool dilué enlè- « vent la plus grande partie de ce dichlorhydrate.) Les erreurs « ne dépassent pas 1 % en moyenne. Dans le précipité, on ne « trouve que des traces de nitrates décelables à la brucine. »

D'après L. W. HAASE (27), si le fer bivalent ne gêne pas, « le fer trivalent doit être réduit quand la teneur par litre « d'eau à doser est supérieure à un milligramme. Les sels de « manganèse n'influent pas, et le chlorure de calcium agit « seulement dans le cas de teneurs élevées, mais le sulfate « de magnésie dissout très nettement le précipité de sulfate « de benzidine. »

i) Méthodes de dosage indirect à la benzidine

La solution de sulfate à doser est amenée à neutralité, puis additionnée d'une solution chlorhydrique de chlorhydrate de benzidine de titre connu en HCl. Les liquides de lavage sont

réunis au filtrat et on dose alors l'acidité du mélange. De la différence d'acidité entre la solution benzidinique et le mélange (filtrat + liquides de lavage), on déduit la quantité de sulfate précipité.

Initialement : acidité liqueur benzidinique = acidité HCl + acidité HCl du Chl. de B.

Finalement : acidité du mélange = acidité liqueur benzidinique — acidité HCl du Chl. de B. qui a précipité SO^4 .

Cette méthode, qui a été préconisée par WOLF MULLER (97), a été utilisée par ZIMMERLUND et SVANDBERG (101), M. TALENTI (88), et appliquée au dosage des bases totales du sérum après minéralisation sous forme de sulfates par W. C. STADIE et C. ROSS (86), qui ont étudié tous les facteurs pouvant intervenir. Ils n'ont pas trouvé de désavantage à la méthode indirecte qui évite :

- « 1° De transporter une toute petite quantité de précipité;
- « 2° De laver le précipité à l'acétone;
- « 3° De transporter dans le vase où a été faite la précipitation le précipité lavé aux fins de titration;
- « 4° De titrer à chaud le sulfate de benzidine précipité;
- « 5° De faire un titrage à blanc du papier filtre.
- « Quoique le sulfate soit moins soluble dans l'acétone, les lavages ont ici moins d'importance; toutefois, leurs résultats sont meilleurs à l'acétone. »

Théoriquement et pratiquement, un excès de 100 % du réactif benzidinique assure l'insolubilité du sulfate de benzidine. Un excès de 200 % donne encore de très bons résultats. Le temps de précipitation avant la filtration n'a aucune influence. La précipitation à chaud donne les mêmes résultats à froid et elle est indépendante pour une variation de pH 1, 6 à 7. La présence des phosphates ne gêne pas quand elle ne dépasse pas 10 milliéquivalents de P. pour 100 à 150 milliéquivalents de base (erreur de 1 à 2 %), ce qui est le cas des sangs normaux.

Méthode des auteurs. — A 20 cm³ de la solution amenée au virage à la phthaléine par la soude N/50, ils ajoutent :

2 cm ³ solution titrée de benzidine	Benzidine.....	4 gr.
(titrée par la soude N/50)	HCl N.....	45 cm ³
	Eau q.s.p....	250 cm ³

Ils filtrent sur erlenmeyer et titrent sur 15 cm³ du filtrat en ajoutant de l'indicateur, s'il y a lieu.

La solution titrée de chlorhydrate de benzidine doit être vérifiée très souvent.

d) Méthodes colorimétriques à la benzidine

La benzidine est facilement oxydable et, suivant les cas, on obtient des colorations variées. Par diazotation et copulation, on peut aussi réaliser de très diverses colorations. Les colorations obtenues ne peuvent pas toutes être utilisées; il faut, en effet, qu'elles soient proportionnelles à la quantité de benzidine en présence et qu'elles ne soient ni trop intenses, ni insolubles.

On peut doser soit la benzidine du sulfate précipité (procédé de choix), soit la benzidine en excès d'un réactif de titre connu en benzidine. Les conditions de précipitation, de séparation et de lavage du précipité sont évidemment les mêmes que dans les méthodes précédentes. Comme pour les méthodes néphélométriques, des solutions étalons de titres voisins aux solutions à doser, devront subir les mêmes traitements que ces dernières.

JUNZŌ YAMAZAKI (99) utilise la coloration jaune canari que donne à la température du laboratoire, en présence de petites quantités d'HCl et d'alcool, le furfurol avec la solution aqueuse de chlorure de benzidine. Si l'intensité de cette coloration est proportionnelle aux quantités de benzidine quand le furfurol est en excès, cet excès étant toujours le même, elle dépend cependant de cette proportion de furfurol et aussi de l'acidité du milieu. L'HCl et les chlorures ont notamment un effet néfaste.

Une dose de 2 mgr. à 2,5 mgr. en H²SO⁴ pour 10 cm³ (teneur de 0 mgr. 065 à 0 mgr. 082 de S par cm³) peut être déterminée. L'auteur a appliqué sa méthode à l'urine. Il emploie pour filtrer, laver et redissoudre son précipité l'appareil de FONTES et THIVOLLE et se sert du mélange à parties égales, alcool absolu + soude N, pour redissoudre le précipité. La précipitation et le lavage sont faits conformément aux indications données par

Mme POHORECKA-LESLEZ. (A noter qu'il sépare les phosphates au préalable, selon la méthode de FISKE.)

R. S. HUBBARD (34) précipite le sulfate par une solution acétonique de la base benzidine. Le précipité, lavé à l'acétone pure, est redissout dans HCl dilué, et la benzidine est oxydée par l'eau oxygénée étendue et le perchlorure de fer. On compare la coloration jaune obtenue avec celle que donne une solution étalon. L'auteur a appliqué sa méthode au sang après défécation à l'acide trichloracétique, et conclut que les phosphates ne gênent pas, même à des concentrations plus élevées que normalement. Le NaCl en concentrations identiques à celle du sang ne gêne pas. On peut doser 0,001 à 0 mgr. 1 de S à l'état de sulfates. E. G. WAKEFIELD (93) a modifié cette méthode. Il rappelle qu'il est indispensable d'avoir la même acidité chlorhydrique dans la solution à titrer et la solution étalon. Il obtient de très bons résultats pour des doses de chlorhydrate de benzidine équivalentes à 0 mgr. 06 à 0 mgr. 15 de sulfate de benzidine, les résultats les plus parfaits étant obtenus pour la valeur moyenne 0 mgr. 06. (Correspond à 0 mgr. 0007 de S.)

S. YOSHIMATSU (100) traite le sulfate de benzidine par le mélange (IK, 1, NH^3). La coloration brune qui est produite est comparée à celle donnée dans les mêmes conditions par une solution étalon.

Bernard S. KAHN et S.-L. LEIBOFF (39), après avoir dissous le sulfate dans HCl, diazotent par NO^2Na et copulent en milieu alcalin avec le phénate de soude. La coloration jaune obtenue permet des dosages colorimétriques.

D'après les auteurs, les phosphates, même en quantité supérieure à celle des urines, ne gênent pas. Il en est de même pour l'HCl et les chlorures. Les quantités d'alcali ou de phénol en excès n'ont pas d'effet sur le développement de la couleur.

Pour une solution étalon à 0 mgr. 05 de S. par cm^3 , on opère sur 2 cm^3 . Les résultats sont exacts à 1 % près.

d) Méthode de A. Boivin de dosage de traces de sulfates, par évaluation du carbone renfermé dans le sulfate de benzidine.

Nous avons vu comment l'auteur précipite et lave par une solution chlorhydrique et saturée de sulfate de benzidine. Après un lavage final à l'alcool, le filtre est séché par un courant d'air, puis à l'étuve à 40°. Il procède ensuite au dosage du carbone de sulfate de benzidine par la méthode NICLOUX-BOIVIN.

Le microdosage du carbone se ramenant finalement à déterminer la quantité d'alcali qui est combinée au CO^2 équivalent à une molécule d' H^2SO^4 , il en résulte que la sensibilité du dosage de l' H^2SO^4 « par le carbone » du sulfate de benzidine est douze fois plus grande que celle du dosage du même acide selon RASCHIG, une molécule d'acide étant combinée à 12 atomes de carbone dans le sulfate de benzidine. L'erreur est de 1 à 3 %.

CHAPITRE III

METHODE DE DOSAGE DE L'ION SO^4 DE MINDALEW

Z. MINDALEW (62) dose directement l'ion SO^4 à l'aide d'une solution titrée de $(\text{NO}^3)^2\text{Pb}$: $\text{SO}^4\text{K}^2 + (\text{NO}^3)^2\text{Pb} = \text{SO}^4\text{Pb} + 2\text{NO}^3\text{K}$.

La fin du dosage est indiquée par la coloration jaune franc que donne le $(\text{NO}^3)^2\text{Pb}$ avec l'iodure de potassium.

1°) Détermination du titre de la solution de plomb. A 10 cm^3 de solution N/10 de SO^4K^2 , ajouter 10 cm^3 alcool et 3 gouttes de solution IK saturée à froid (ou 0 cm^3 06). Verser la solution sensiblement N/10 de $(\text{NO}^3)^2\text{Pb}$ jusqu'à coloration jaune franc.

2°) Dosage de l'ion SO^4 . On répète les mêmes opérations. Le titre de l' H^2SO^4 à doser doit être compris entre 0,05N et 0,1N. (Opérer à la lumière du jour).

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA METHODE DE DENIS ET Mlle REED

MODIFICATIONS APPORTEES TECHNIQUE PROPOSEE

Les auteurs recommandent de réaliser la précipitation à un pH 3 à 3,8, en présence de ClNa et de gélatine; les quantités de soufre à doser par cm^3 devant osciller entre 0 mgr. 02 et 0 mgr. 20.

Nos solutions étalons ont été préparées à partir d'une solution normale d' H^2SO^4 vérifiée par pesée du SO^4Ba et du SO^4Am^2 . Une première dilution mère à 0 mgr. 5 de S par cm^3 a été obtenue en prenant

H^2SO^4 N	31 cm^3 25
Eau dist. q.s.p. . .	1000 cm^3

Par dilution avec de l'eau distillée, nous avons préparé des solutions plus étendues, notamment la solution à 0 mgr. 05 de S par cm^3 . Ces solutions ont un pH légèrement inférieur à 3, mais nous avons vérifié, au cours de nos dosages, que les mêmes solutions amenées à pH 3 par la soude (virage jaune du bleu de thymol et du bleu de bromo-phénol) nous donnaient les mêmes résultats.

Les auteurs recommandent de précipiter à pH 3, or ils réalisent un pH qui correspond à N/40 (pH voisin de 1,6). Pour nous conformer à l'acidité voulue, nous avons employé de la soude 0,8 N au lieu de soude 0,6 N. En outre, pour éviter toute cause d'erreur pouvant résulter de la mesure des différents réactifs, nous avons utilisé la solution « gélatine-chlorure de baryum N° 1 » renfermant les proportions voulues de chaque réactif :

HCl N/10	1.000 cm ³
NaOH 0,8 N.....	120 cm ³
Solution de gélatine à 5 % privée de sulfates.....	40 cm ³
Solution de chlorure de baryum à 5 %.....	40 cm ³

Cette solution de pH 3 est de conservation supérieure à la solution de gélatine à 5 % qui est, comme on le sait, un excellent milieu de culture. Au bout de quelques jours, elle peut être envahie par des organismes inférieurs, mais après filtration sur papier filtre sans cendres, elle fournit les mêmes résultats qu'au début. Nous en assurons la parfaite conservation en présence de toluène.

Nous pratiquons donc la méthode en ajoutant à 1 cm³ de la solution à doser (pH voisin de 3) la quantité voulue de solution « gélatine-chlorure de baryum N° 1 ». (Si la solution à doser est à un pH 1,5 à 8, le pH final est toujours très peu différent de 3 quand le volume de solution précipitante ajoutée est de 30 cm³).

EMPLOI D'UN PHOTOMETRE

Pour mesurer le trouble obtenu, nous employons le photomètre de VERNES, BRICQ et YVON, muni de l'écran Wratten N° 70, qui permet de mesurer la diminution d'intensité de la lumière en rapport avec le trouble de la suspension.

« Sommairement, cet appareil engendre un faisceau lumineux de couleur rouge ($\lambda > 650 \mu\mu$) qui se bifurque. Un pinceau traverse une petite cuve à faces parallèles contenant la suspension sous 1 cm. d'épaisseur. L'autre pinceau rencon-

« tre, sur son trajet, un coin de gélatine fumé, et, selon l'épais-
« seur sous laquelle il le traverse, subit une atténuation d'éclat
« plus ou moins grande.

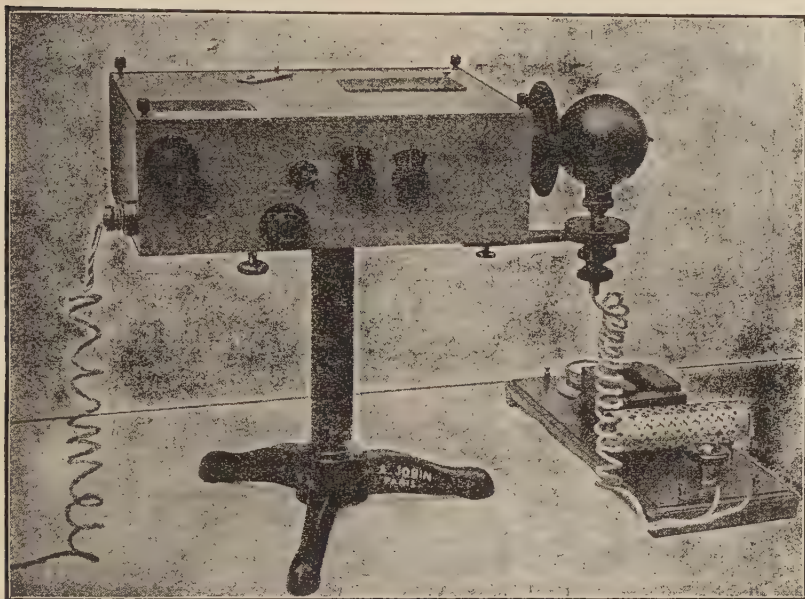
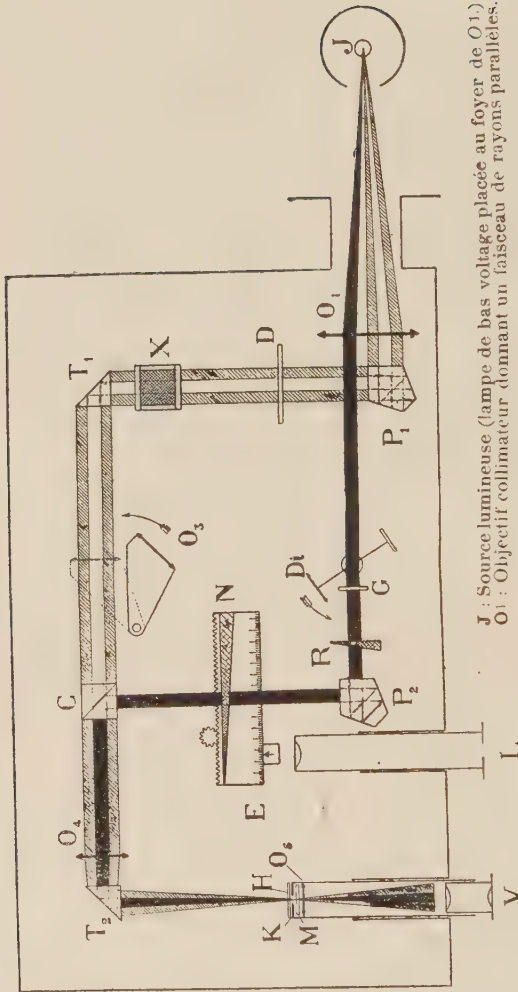


FIG. 1. — Photomètre de Vernes, Bricq et Yvon (1)

« Finalement, les pinceaux sont ramenés au contact et
« donnent dans une lunette d'observation une image formée
« de trois bandes verticales, affaiblies ou non dans leur éclat,
« et à des degrés différents, celles des bords par la suspension
« à examiner, et celle du centre par l'épaisseur du coin fumé
« interposé. L'observateur fait, au moyen d'une vis micro-
« métrique, varier l'épaisseur interposée du coin fumé, et
« obtient ainsi l'égalité d'éclat des trois bandes. Il n'a plus
« qu'à lire alors le chiffre qui apparaît dans une petite lunette
« et qui correspond, suivant la position de la cuve, au degré
« d'absorption, si on observe le faisceau lumineux réfracté.

(1) Le cliché de cette figure nous a été gracieusement prêté par M. Bricq que nous remercions de son obligeance.



J : Source lumineuse (lampe de bas voltage placée au foyer de O_1)
 O_1 : Objectif collimateur dominant un faisceau de rayons parallèles.

Premier pinceau lumineux.

- P₁ : Prisme pentagonal (équerre optique).
D : Surcharge, que l'on peut à volonté placer ou enlever.
X : Loge métallique, dans laquelle se met la cuve destinée à contenir le liquide à examiner.
T₁ : Prisme triangulaire à réflexion totale.
Le système X et T₁ se trouve sur une plate-forme mobile susceptible d'être tournée pour lecture en lumière diffusée.
O₃ : Objectif qui s'introduit sur le trajet lumineux dans les mesures en lumière diffusée.
C : Cube fourni par deux prismes triangulaires accolés par leur face hypothénuse, dont l'une porte en son milieu une bande verticale argentée formant miroir.
O₄ : Objectif dont le foyer est sur la glace H, où il donne une première image de la source lumineuse.
T₂ : Prisme triangulaire à réflexion totale.

Deuxième pinceau lumineux.

- D₁ : Système pour examens en lumière diffusée.
G : Surcharge que l'on peut à volonté placer ou enlever.
P₂ : Prismes pentagonal (équerre optique).
N : Coin photométrique mobile étalonné.
E : Échelle graduée du coin N.
R : Contre-coin de même angle que N, disposé en sens inverse.
Lunette d'Observation.
V : Visneur avec son oculaire, où l'œil aperçoit les deux plages d'observation qu'il importe de rendre semi-blanches.
O₅ : Objectif du viseur.
K : Diaphragme de 2 m/m sur lequel s'enclasse un filtre coloré en rouge.
L : Loupe avec laquelle se lisent les résultats.

FIG. 2. — Marche des rayons lumineux dans le photomètre.

Tracé gris : faisceau lumineux traversant en X le liquide à examiner et se dédoublant en C ;

Tracé noir : faisceau traversant le coin N, étalon.

« En effet, on observe une diminution d'intensité de la
« lumière en rapport avec le trouble de la suspension et, plus
« les granules en suspension sont nombreux et gros, plus ils
« s'opposent au passage de la lumière, et moins il y a de lumière
« transmise. Le contenu de la cuve fait donc écran à la
« lumière.

« Les chiffres de l'échelle du photomètre donnent sans
« transposition, ni calcul, le degré de ce qu'on appelle la
« *densité optique* (logarithme du rapport entre la quantité de
« lumière reçue par la cuve et la quantité de lumière trans-
« mise) (91) ».

L'augmentation de la densité optique d'un liquide due, soit à une coloration, soit à un précipité colloïdal, sera déterminée par la différence des valeurs des densités optiques de la solution colorée ou colloïdale et de la même solution témoin incolore ou sans précipité.

Pour se prêter à une lecture correcte et sans erreur appréciable, l'intensité des plages observées ne doit pas être ni trop vive, ni trop sombre. L'erreur de plusieurs lectures successives de la même solution doit être inférieure à une ou deux divisions photométriques. Pour les densités optiques inférieures de 15 à 20, il est bon d'interposer sur le trajet du pinceau lumineux traversant la cuve, une surcharge de valeur égale à 170-250 divisions photométriques et pour les densités optiques comprises entre 15 et 145, une surcharge égale à 140 environ. Le photomètre que M. le Dr FOURNIER avait bien voulu mettre à notre disposition est muni des surcharges 139 et 272. A notre avis, la meilleure zone de lecture, avec la surcharge $A = 139$ a lieu pour des densités optiques comprises entre 25 et 145. Avec quelque pratique, on lit à moins d'une division près dans cette zone et avec une erreur de 2 à 3 divisions pour les densités optiques inférieures à 15.

Précaution très importante. — Il faut prendre soin de ne pas introduire d'air dans le liquide qui est dans la cuvette et d'essuyer celle-ci extérieurement avant de l'introduire dans l'appareil.

ETUDE DE LA METHODE DANS LE CAS D'UNE SOLUTION PURE

Il est indéniable que la présence de gélatine est indispensable pour obtenir une solution colloïdale stable (sans gélatine toute lecture photométrique est impossible). Nous avons étudié l'influence sur la lecture au photomètre :

1°) Du temps de repos qui suit la précipitation;

2°) De la présence du chlorure de sodium;

3°) Du pH initial de la solution à précipiter. En outre, nous avons cherché à délimiter quelles proportions respectives de solution à doser et de solution précipitante on pouvait employer suivant la teneur en S de la première solution.

1) Influence du temps de repos qui suit la précipitation sur la valeur de la densité optique.

1 cm ³ de solution renfermant en mgr de S	Volume en cm ³ de solution « gélatine chlor. de baryum n° 1 »	Valeurs des Densités optiques après				
		1 ^m	15 ^m	30 ^m	60 ^m	24h
0,005	1	5	5	6	6	6
0,010	1	12	12	12	13	13
0,020	1	25	25	26	26	26
0,030	1	39	39	39	39	39
0,040	1	52	52	52	52	52
0,050	1	62	62	62	62	62
0,05	15	7		8	8	9
0,10	15	17		17	17	16
0,15	15	24		24	24	24
0,20	15	30		30	30	31
0,25	15	36		37	37	38
0,05	30	2	2	3	3	3
0,10	30	7	7	8	8	8
0,15	30	12	12	12	13	13
0,20	30	14	16	16	16	16
0,25	30	17	20	21	21	21

Chaque chiffre représente une moyenne de quatre lectures qui, d'ailleurs, concordent à une division près.

Passé le temps de quinze minutes, la solution colloïdale est donc stabilisée et la densité optique reste constante, même

au delà de vingt-quatre heures (il est évidemment nécessaire de remettre en suspension par agitation le précipité qui s'est déposé). Dans nos dosages, nous faisons les lectures après un temps de repos d'au moins trente minutes. Toutes les fois que nous avons répété les lectures après vingt-quatre heures de repos, nous avons eu les mêmes résultats à une unité près.

II) Influence de la présence du chlorure de sodium.

La précipitation a eu lieu avec la solution précipitante modifiée comme suit :

Solution de gélatine à 5 %.....	1 cm ³
HCl N.....	1 gtte
Solution de BaCl ² à 5 %.....	1 cm ³
Eau distillée.....	28 cm ³

Les valeurs des densités optiques ont été trouvées identiques à une unité près selon qu'on emploie la solution précipitante modifiée ou non (ce fut cette constatation qui nous amena à supprimer le ClNa dans la solution « gélatine-chlorure de baryum N° 2 »).

III) Influence du pH initial de la solution à précipiter.

Trois solutions de S à 0 mgr. 05 par cm³ ont été préparées.

	Sol. 1 pH=8	Sol. 2 pH=3	Sol. 3 pH=1
Sol. H ² SO ⁴ à 0 mgr. 5 de S par cm ³ ...	10 cm ³	10 cm ³	10 cm ³
NaOH N/10	3,5	2 cm ³	
HCl N	—	—	10cm3
Eau distillée q.s.p.....	100 cm ³	100 cm ³	100 cm ³

Les dosages ont été pratiqués en ajoutant un volume égal de la solution « gélatine-chlorure de baryum N° 1 » (1) à :

1 cm ³ de chaque sol. + 4 cm ³	} Eau distillée à pH ^a pour la sol. 1 — à pH ^a — 2 HCl N/10 — 3
3 cm ³ — + 2 cm ³	
5 cm ³ —	

(1) Cf, p. 48.

5 cm ³ sol. renfermant en mgr. de S par cm ³	Densités optiques selon que :		
	pH=8	pH=3	pH=1
0,01	13	13-13-13-13	14-14-14-14
0,03	39	39-41-39-39	45-42-41-41
0,05	64	66-66-66-63	71-69-69-69

Comme le montre le tableau ci-dessus, l'*acidité fait légèrement croître la densité optique*, ce qui paraît surprendre au premier abord et ne peut s'expliquer que par une évolution plus rapide du précipité avant sa stabilisation, ou formation d'un précipité à grains plus fins. Toutefois, cette faible erreur pour des solutions de pH supérieur à 1 pourra être réduite par suite d'un réglage approximatif à un pH 2 à 3, ou mieux en comparant à une échelle étalon de même pH. Il est évident que si le volume de solution gélatine-chlorure de baryum ajoutée est plus grand, l'influence du pH initial est encore moins importante. Nous verrons que si, dans le cas de précipitation à pH 2 à 3, la densité optique du trouble obtenu croît linéairement avec la teneur en S, par contre les mesures de densité optique n'ont plus grande valeur quand l'acidité du milieu est par trop élevée. La brève étude que nous en avons fait (tableau de la page 86 et tableau de la page 94) lors du dosage du soufre sanguin, nous a permis de constater qu'aucun trouble n'a lieu pour les très faibles doses de soufre, et que lorsqu'on augmente la dose le trouble croît très rapidement et selon une expression géométrique qui ne paraît pas simple. Nous interprétons le phénomène comme résultant d'une accélération de l'évolution du précipité qui est peut-être aussi à grains plus fins, action masquée partiellement par la solubilisation due à l'acidité.

IV) Influence des proportions relatives de sulfates et de gélatine sur la valeur de la densité optique obtenue.

Nous avons étudié les variations de la densité optique :

1° Quand la dose de soufre varie, le volume restant constant;

2° Quand la dose de soufre étant constante, le volume varie.

Pour arriver à doser avec plus de précision les solutions très pauvres en soufre, nous avons été amenés à diminuer très considérablement le volume de solution précipitante ajouté. Comme alors les quantités de Cl^2Ba et de gélatine peuvent être trop faibles (0 cm^3 5 de solution mélange peut suffire, 0 cm^3 2 est insuffisant), nous employons pour les très faibles doses la solution « gélatine-chlorure de baryum N° 2 ».

Solution de gélatine à 5 %.....	100 cm^3
Solution BaCl^2 à 5 %.....	100 cm^3
HCl N.....	100 cm^3
Eau distillée q.s.p.....	1.000 cm^3

La densité optique présente une valeur très peu différente de 12,5 pour les proportions :

Solution de soufre à 0 mgr. 01 par cm^3	1 cm^3
Solution gélatine chlorure de baryum n° II.....	1 cm^3

Il est évident que même en réduisant au minimum l'addition de solution gélatine-chlorure de baryum, le maximum de densité optique observé ne peut atteindre 25 (double de 12,5), si petit que soit le volume de solution précipitante ajouté. Pour 1 cm^3 de solution à doser, et 0,2 cm^3 de solution « gélatine-chlorure de baryum N° 2 », soit en pratique 5 cm^3 et 1 cm^3 de ces solutions, la densité optique sera d'environ 21; nous avons choisi ces proportions parce que faciles à mesurer et parce que même en prenant un volume plus grand de solution à doser, on ne gagne guère en précision. En outre, dans les liquides biologiques, les prises d'essai sont forcément restreintes.

A l'examen du tableau (I) ci-dessous, on constate que la
Densité optique
proportionnalité ————— est respectée dans des
Teneur en S par cm^3

limites assez larges. On peut même considérer que toute densité optique inférieure à 80 est exacte, ce, évidemment, en respectant les proportions indiquées de solution à doser et de solution précipitante. Les chiffres en caractères gras représentent les valeurs théoriques des densités optiques en adoptant une densité optique égale à 25 pour une teneur finale de 0 mgr. 01 de soufre par cm^3 .

1 cm³ sol.
renferment
en mg de S

	0,2 sol. N. II (1)		N. I (2)						
	1	2	4	8	15	30			
0,0025	5-6	5							
0,003	9-10-10-10	10,5							
0,0075	16-15	16							
0,01	21-20-20-21	21							
0,02	41-40-40-40	42							
0,03	61-59	63							
0,04	77-78	84							
0,05	37-96	105							
0,10									
0,15									
0,20									
0,25									

TABLEAU I

Valeur des Densités optiques, expérimentales et théoriques.

Les valeurs théoriques sont indiquées en caractères gras.

Le double trait horizontal limite les valeurs de densités optiques qu'on doit considérer comme exactes, les valeurs inscrites au dessous nécessitant une nouvelle mesure après dilution.

(1) Cf. p. 55
(2) Cf. p. 48

Conclusions

Nous conseillons pour ceux qui ne voudront pas faire de gamme à chaque dosage, d'adopter les densités optiques théoriques ci-après du tableau II.

TABEAU II

5 cm ³ sol. renfermant en mgr. de S par cm ³	Volume de solution-gélatine 1 cm ³ n° II	chlorure de baryum ajouté 5 cm ³ n° I
—	—	—
0,0025	5	—
0,005	10	—
0,0075	15	6
0,010	20	12 à 13
0,015	30	18 à 19
0,020	40	24 à 25
0,025	50	30 à 31
0,030	60	36 à 37
0,040	—	48 à 50
0,050	—	60 à 62

Nous avons toujours employé le même échantillon de gélatine, mais nous ne pensons pas qu'avec des échantillons d'une autre source, nos résultats auraient été différents.

Les valeurs discordantes trouvées sont dues très souvent soit à deux erreurs de lecture qui s'ajoutent, soit à la verrerie employée qui n'est pas propre, soit aux erreurs de mesure des liquides. Nous avons vu que ni le NaCl, ni la gélatine en excès n'influent sur la valeur de la densité optique. Des séries de dosages faites en double en utilisant uniquement la solution à 0 mgr. 05 de S par cm³ ont été préparées dans le cas des solutions de titre inférieur, soit avec de l'eau distillée, soit avec de la solution « gélatine-chlorure de baryum » : les résultats obtenus ont été identiques.

L'acidité fait croître la densité optique. Dans un dosage, l'erreur pouvant en résulter est éliminée si on prépare simultanément une gamme dans les mêmes conditions de milieu.

Toute lecture de densité optique supérieure à 60 doit être suspectée d'erreur, et toute densité optique supérieure à 80 considérée comme inexacte.

Valeur de la méthode.

L'erreur de lecture étant pratiquement d'une division photométrique, l'erreur relative du dosage pour n divisions est donc

au moins égale à $\frac{1}{n} \times 100$. En outre, si l'éclat des plages

observées est trop vif, l'observation en est plus difficile, et l'erreur de lecture accrue. Elle peut atteindre 2 à 3 divisions photométriques, lorsque le jeu des surcharges ne permet, pour les faibles densités optiques, qu'une observation en plages ou trop vives ou trop sombres. On facilite la lecture en plages vives en diminuant le voltage de la lampe, source lumineuse. (Nos lectures sont faites avec le voltage maximum de 9 v. 5, mais elles sont encore identiques pour un voltage de 7 v.).

Nous avons vu qu'on peut parfois obtenir une valeur de densité optique discordante. Dans ce cas, l'erreur peut atteindre 20 %, mais elle est généralement inférieure à 10 %. On diminue cette erreur possible en mesurant les densités optiques de différentes dilutions de la solution à doser quand toutefois le volume et la teneur en soufre le permettent, et si on a préparé dans les mêmes conditions de dilution et d'acidité une gamme étalon, l'erreur relative est pratiquement réduite

à l'erreur de lecture $\frac{100}{n}$.

Pour les solutions renfermant moins de 0 mgr. 01 de S par cm^3 , l'erreur est supérieure à 10 %, atteignant même 50 % pour la solution à 0 mgr. 0025 de S par cm^3 . Pour une teneur de 0 mgr. 04 de S par cm^3 (soit 40 mgr. par litre), l'erreur n'est plus que de 5 % au maximum.

MÉTHODE DE DENIS ET Mlle REED MODIFIÉE DANS LE CAS DU DOSAGE D'UNE SOLUTION NE RENFERMANT PAS QUE DES SULFATES

Cette méthode devant s'appliquer aux liquides biologiques, nous avons opéré sur une solution de composition voisine à

celle d'urines normales, mais pauvres en sulfates. La précipitation devant se faire en milieu acide pour ne précipiter que le SO^4Ba , nous avons, comme dans le cas d'une solution pure, étudié l'influence de la réaction du milieu.

A partir de la solution I :

Acide urique.....	0 gr. 40
NaOH N	15 cm ³
Acide oxalique.....	0 gr. 03
Phosphate disodique.....	8 gr.
Chlorure de sodium.....	12 gr.
Eau distillée q.s.p.....	1.000 cm ³

nous avons préparé quatre solutions renfermant par cm³ :

0 mgr. 125	SO^4	ou	0 mgr. 05	S
0 mgr. 16	P^2O^5	—	0 mgr. 07	P
0 mgr. 12	NaCl	—	0 mgr. 073	Cl

Solution H^2SO^4 à 0 mgr. 5 S

par cm ³	10 cm ³	10 cm ³	10 cm ³	10 cm ³
Solution I.....	10 cm ³	10 cm ³	10 cm ³	10 cm ³
HCl N.....	5 gouttes	10 cm ³		
$\text{CCl}^3\text{CO}^2\text{H}$ à 20 %.....			50 cm ³	50 cm ³
NaOH pur.....			5 cm ³ 6	
Eau distillée q.s.p.....	100 cm ³	100 cm ³	100 cm ³	100 cm ³
	Sol. A	Sol. B	Sol. A'	Sol. B'
pH	2,5	1	2,5	1

Le dosages pratiqués sont relatés au tableau III (les dilutions des solutions ont été faites avec des solutions identiques dans lesquelles la solution d' H^2SO^4 à 0 mgr. 05 de S a été remplacée par de l'eau distillée).

TABLEAU III

5 cm ³ solution renfermant en mgr. de S par cm ³	Valeurs des densités optiques obtenues avec					
	Solution pure de S		Solutions			
	de		A	B	A'	B'
	pH 2,5	pH 1	pH 2,5	pH 1	pH 2,5	pH pl. petit que 1
0,01	12-12,5	14	13	14-14	14-13	13
0,03	37-38,5	41	41	43-41	42-42	41
0,05	61-63	69	66	71-70	70-68	69

A chaque 5 cm³ de sol. de S on a ajouté 5 cm³ de solution « gélatine Cl^2Ba » n° 1

Sur le tableau IV figurent les dosages effectués sur une solution complexe de titre différent en soufre (0 mgr. 064 par cm^3). Il ressort très nettement de l'examen du tableau que, dans ce cas, la densité optique croît, avec le pH final, augmentation due à une précipitation d'autres sels de baryum, très probablement des phosphates, et non à l'influence possible que pourraient exercer ces derniers par leur simple présence. En effet, si à la liqueur dans laquelle on précipite d'autres sels de baryum que le sulfate, on ajoute des quantités connues de sulfates, on les retrouve quantitativement par mesure des différences de densités optiques, comme il est indiqué dans les trois dernières colonnes du tableau IV. Le témoin correspondant à cette solution, sans soufre, précipite d'ailleurs dès que le pH s'élève à 4.

TABLEAU IV

5 cm^3 solution renfermant en mgr. de S p. cm^3	Pure de pH 2,5	Valeurs des densités optiques obtenues avec les solutions		Complexe après addition à la solution de		
		Complexe de pH 2,5	pH 6	0 mgr. 01 de S par cm^3 pH 2,5	0 mgr. 02 de S par cm^3 pH 6	pH 6
0,0128	14	14	18,5			
0,0256	28	28	38	40		65
0,0384	42	42	59	54		83
0,0512	58	58	74		85	
0,0640	72	72	92			

A chaque 5 cc de solution de S à doser on a ajouté 5 cm^3 de solution « gélatine Cl^2Ba » n° I

Conclusions

Comme dans le cas d'une solution simple, l'acidité augmente légèrement la valeur de la densité optique, et ce, d'une façon identique.

Si la précipitation se fait en milieu suffisamment acide pour ne précipiter que du sulfate de baryte, l'influence des autres sels est nulle.

COMMENT PRATIQUER

LA METHODE NEPHELEMETRIQUE

1° S'assurer que la solution à titrer est *acide au bleu de bromophénol*. Très souvent d'ailleurs on connaît approximativement son acidité.

2° *Essai préalable*. — Si on ignore le titre approximatif de la solution à doser, ajouter à 2 cm³ de dilutions de plus en plus étendues, de la solution à doser, 0 cm³ 4 de la solution « gélatine-chlorure de baryum N° 2 ». Prendre les densités optiques qui guideront pour l'obtention de la dilution qui se prêtera le mieux au dosage. Cet essai préalable est généralement superflu.

3° *Dosage*. — Nous conseillons de précipiter simultanément une gamme de la solution amenée à la dilution voulue, et une gamme étalon réglée à la même acidité. Suivant les cas, on fera une gamme complète ou incomplète, en observant les indications du tableau II, page 57. Deux cm³ de solution sont suffisants pour la détermination d'une lecture néphélémétrique.

On lit une densité optique égale à n divisions.

4° *Résultats*. — L'erreur est forcément supérieure à $\frac{100}{n}$

Elle peut atteindre 20 % pour les très faibles dilutions et même 50 % pour une teneur égale à 0 mgr. 0025 S par cm³, mais elle n'est plus que de 5 % pour des doses supérieures à 0 mgr. 01 de S par cm³.

Pour les solutions plus riches (teneur en S supérieure ou égale à 0 mgr. 05 par cm³) et qu'il faut diluer avant dosage, nous arrivons à un dosage présentant une erreur inférieure à 5 % sans nous inquiéter de l'acidité initiale de la solution à doser si toutefois cette acidité n'est pas supérieure à N/10.

CHAPITRE V

ETUDE DE LA METHODE BENZIDINIQUE TECHNIQUE PROPOSEE

Modifications apportées à la méthode benzidinique DE LA PRECIPITATION

Nous avons vu que les conditions à réaliser sont les suivantes :

1° Milieu suffisamment acide pour éviter la précipitation de la benzidine base et de ses sels autres que le sulfate.

2° Milieu point trop acide cependant pour ne pas augmenter la solubilité du sulfate de benzidine et ne pas surcharger de dichlorhydrate, le précipité.

3° Excès de liqueur précipitante pour assurer une plus grande insolubilité du sulfate formé.

Il est évident qu'on ne peut simultanément assurer la complète précipitation du sulfate de benzidine et éviter la moindre surcharge due à du dichlorhydrate et il est entendu que la solubilité du sulfate de benzidine limite la teneur minimum de SO^4 qu'on peut doser.

La surcharge du précipité peut être due à des sels de benzidine autres que le chlorure, notamment le phosphate. Le pH à réaliser pour ne précipiter alors que le sulfate dépend de la teneur en phosphates. Il est compris entre 2 et 3 pour les solutions peu riches, mais il doit être de 1,2 à 2 pour les solutions à teneur plus élevée, mais renfermant moins cependant de 5 gr. de P^2O^5 par litre. Il est donc des cas où il faut soit éliminer les phosphates au préalable, comme le fait FISKE, dans le dosage du soufre urinaire, soit chercher un solubilisant du phosphate de benzidine qui peut se former, solubilisant qui soit sans action sur le sulfate.

Nous considérons que l'addition d'acétone à 95 %, d'alcool, ou d'alcool-éther, joue partiellement ce rôle, en ayant soin toutefois d'ajouter des solvants avant la solution benzidinique précipitante, leur rôle étant alors plus marqué.

La plupart des auteurs emploient une solution chlorhydrique de chlorhydrate de benzidine, dont le titre en HCl est d'ailleurs variable. *Toute méthode, utilisant un tel réactif ne pourra donc être exacte que par compensation d'erreurs* (solubilité du sulfate de benzidine, surcharge due au chlorhydrate), puisque la précipitation se fait en milieu chlorhydrique. *Elle ne sera, en outre, exacte que si l'on suit textuellement les détails de technique et si on dose des solutions de teneur en H^2SO^4 comprises dans des limites bien déterminées.* Ainsi, la méthode de RASCHIG (75), d'après L.-W. HAASE (27) donne des résultats à 1 % près pour des doses supérieures à 80 mgr. H^2SO^4 par litre, à 5 à 10 % pour des teneurs comprises entre 30 et 80 mgr. et ne doit plus être employée pour des teneurs inférieures à 30 mgr., les résultats trouvés étant beaucoup trop faibles. RASCHIG (76) a fait remarquer qu'il fallait alors employer la solution mère de benzidine à 40 gr. pour 1.000 au lieu de la solution diluée de cette dernière à 1 pour 20. pour ne pas diluer la solution à doser et par suite ne pas augmenter la solubilité du sulfate de benzidine. De plus, il introduit une correction due à la solubilité de ce sulfate dans un même volume de composition identique, mais privé de sulfates. Dans le cas où l'on ajoute au volume de solution à doser son 20^e de la solution suivante :

Benzidine	4 gr.
HCl pur.....	5 cm ³
Eau distillée q.s.p.....	100 cm ³

la correction est de 1 mgr. 5 SO^3 par litre et on peut doser toute solution renfermant jusqu'à 3 mgr. SO^3 par litre. De même la méthode de O. NYDDEGER (72) ne doit s'appliquer qu'aux solutions neutres ou légèrement acides renfermant de 0,1 à 0,2 % d' H^2SO^4 et n'est exacte que par compensations d'erreurs.

Choix d'un réactif benzidinique

Nous pensons qu'il est logique d'ajuster tout d'abord l'acidité de la solution à doser à un $\text{pH} = 2$ à 2,8 et d'utiliser ensuite une solution benzidinique d'acidité sensiblement voisine. De la sorte, on peut introduire une correction exacte dans les dosages s'il y a lieu. Les solutions benzidiniques de FISKE et de W. C. STADIE et C. ROSS conviennent parfaitement.

	STADIE et ROSS	FISKE
Benzidine	4 gr.	4 gr.
HCl N.....	45 cm ³	50 cm ³
Eau distillée q.s.p.....	250 cm ³	250 cm ³

MM. A. LESURE et A. DUNEZ ont éprouvé de la difficulté à obtenir le réactif de FISKE. Nous le préparons comme suit : Peser 4 gr. de benzidine préalablement pulvérisée très finement au mortier, mettre en suspension dans un ballon jaugé de 250 cm³ avec 150 cm³ environ d'eau distillée; ajouter, par petites quantités et en agitant 50 cm³ HCl N. La dissolution est rapide. S'il reste quelques paillettes de benzidine, les écraser avec un agitateur à bout caoutchouté. Compléter alors avec de l'eau distillée à 250 cm³. Il est presque superflu de filtrer. La conservation en flacon jaune, à l'abri de la lumière est excellente (pas d'altération après huit mois). L'acidité chlorhydrique totale de ce réactif est de 0,2N et l'acidité chlorhydrique libre très faible 0.025 N.

Le réactif de MM. LESURE et DUNEZ est à notre avis beaucoup trop acide, ayant une acidité chlorhydrique totale 0,7 N et une acidité chlorhydrique libre 0,41 N (chlor. de benz. 4 gr. HCl pur $D=1,19$ 4 gr., Eau dist. q. s. p. 100 cm³). La précipitation étant ensuite effectuée à une acidité chlorhydrique 0,2 N, la solubilité du sulfate devient alors trop considérable. Nous utilisons la solution de FISKE, mais nous ajoutons toujours au préalable, à la solution à doser, de l'acétone ou de l'alcool-éther.

WAKEFIELD après R. S. HUBBARD utilise la solution acétonique de benzidine à 5 pour 1.000. Cet emploi peut se justifier par :

1° Sa conservation excellente en flacon jaune à l'abri de la lumière;

2° L'insolubilité du sulfate de benzidine bien assurée.

Il faut évidemment ne pas réaliser un milieu trop riche en acétone, car il y aurait précipitation de chlorure de benzidine qui ne pourrait plus être éliminé. La précipitation possible de benzidine base en milieu trop aqueux est évitée du fait de la faible teneur en benzidine de la solution précipitante, et de l'excès de cette solution employée. Si toutefois, il s'en trouvait de précipitée, elle serait ensuite éliminée au cours des lavages à l'acétone, et au pis-aller elle n'interviendrait toujours pas dans la méthode directe.

Mais la benzidine libère les bases des sulfates et il faut veiller à faire la précipitation en milieu généralement plus acide que dans le cas de précipitation par une solution de chlorure de benzidine. Cette dernière considération nous ramène donc au cas précédent. La solution acétonique de benzidine pourrait être remplacée par une solution dans l'alcool-éther, mais au cours de la précipitation, l'éther se séparant et s'évaporant très vite, nous ne la conseillons pas.

Nous employons avec satisfaction le réactif de FISKE.

DE LA SEPARATION DU PRECIPITE

Le filtre en papier, quand on utilise une solution de chlorhydrate de benzidine, retient avec énergie de ce chlorhydrate quels que soient la nature et le volume du liquide de lavage employé. Nous obvions à cette erreur en filtrant à la trompe sur double papier sans cendres, et nous retranchons du chiffre obtenu avec le filtre du précipité, le chiffre obtenu avec l'autre filtre. Cette erreur est sensiblement constante et égale à $1/20$ à $1/10$ de cm^3 de soude N/50. Nous nous sommes assurés que dans les mêmes conditions de dilution, HCl n'est pas retenu par les filtres.

Nous n'utilisons pas la centrifugation qui est beaucoup trop longue. Le précipité très léger et soyeux nécessite, pour être obtenu compact, une centrifugation minimum de trente minutes à 3.000 tours. Le dosage serait beaucoup trop long, plusieurs lavages devant être effectués.

Nous employons avec entière satisfaction les filtres en verre poreux d'Iéna 10. G. 4. Leur emploi rend rapide le dosage, et la fixation de chlorhydrate sur le filtre n'a pas lieu. Le filtre 10 G. 3., de porosité moins fine, laisse parfois passer le précipité, surtout si la précipitation a été faite par une solution acétonique de benzidine.

LAVAGE DU PRECIPITE

Nous employons comme liquide de lavage l'acétone à 95 % en volume et non l'acétone pure préconisée par MM. A. LESURE et A. DUNEZ, celle-ci précipitant du chlorhydrate de benzidine au cours des lavages comme nous l'avons montré (15). Ici encore, on peut utiliser l'alcool-éther au lieu d'acétone. Quant à laver une dernière fois avec de l'eau distillée pour éviter l'erreur pouvant provenir de l'acidité des dernières traces d'acétone, nous n'en voyons pas l'utilité, cette acidité étant très faible, et le volume d'acétone adhérent au précipité étant négligeable. En tous cas, nous préférons laver une dernière fois à l'alcool-éther qui est neutre à la phthaléine.

Quand on utilise les filtres en verre poreux d'Iéna, *il ne faut jamais laisser dessécher complètement le précipité entre deux additions du liquide de lavage, et en outre, il faut supprimer l'action du vide dès que le dernier liquide de lavage ajouté a passé ;* sinon, la succion produite, fournit des plaquettes de sulfate de benzidine très difficilement hydrolysables. L'hydrolyse est parfois même impossible à terminer correctement si l'action du vide sur le précipité isolé s'est trop longtemps prolongée.

DETERMINATION DE LA QUANTITE DU SULFATE DE BENZIDINE PRECIPITE

On ne saurait songer à peser le sulfate de benzidine après dessiccation à l'étuve à 100° du filtre, taré préalablement. Le poids de sulfate de benzidine, en effet, n'est guère supérieur à celui du SO_4Ba et ce dernier est autrement facile à obtenir pur, après calcination, que le premier après dessiccation.

Parmi les méthodes colorimétriques, on ne peut guère

accorder quelque valeur à celles qui visent au dosage des solutions à 0 mgr. 001, à 0 mgr. 01 de soufre par cm^3 . Car, si avec des solutions de concentrations équivalentes en benzidine, on a des réactions colorées très sensibles et comparables, il n'en est plus de même dans l'application au dosage du soufre, où il faut compter avec les limites de solubilité du sulfate de benzidine et sa séparation. Ces méthodes ne peuvent donc s'appliquer que dans les cas où l'on peut aussi employer la méthode volumétrique directe, et on peut prétendre avec celle-ci à autant de sensibilité et en tous cas à plus de fidélité, si on utilise de la soude N/50 et une burette divisée en centièmes de cm^3 . Elle présente d'autre part l'avantage d'être beaucoup plus simple et de permettre des déterminations de teneur en soufre dans des limites bien plus vastes.

Quant à la méthode volumétrique indirecte, nous ne voyons pas quel avantage elle peut présenter sur la précédente. Nous opérons donc par la méthode directe, en utilisant comme indicateur la phtaléine ou le bleu de bromothymol, moins sensible à l'action de CO_2 . Pour ce dernier réactif, nous arrêtons l'addition de soude au virage bleu franc, qui est précédé d'un virage jaune ou vert. Nous préférons ces deux indicateurs au rouge de phénol.

TECHNIQUE DE LA MÉTHODE BENZIDINIQUE PRECONISEE

Dans un bécher Pyrex, forme haute, de 150 cm^3 , mesurer 5 cm^3 de la solution à doser. Ajouter deux gouttes bleu de bromophénol et ajuster la réaction du milieu à un pH 2,8 à 3. (Si la solution est alcaline ou neutre, ajouter HCl dilué jusqu'à virage jaune. Si elle est acide, ajouter de la soude jusqu'à léger virage bleu et revenir à la teinte jaune par addition d'HCl dilué). Ajouter dans l'ordre 8 cm^3 acétone pure, 2 cm^3 solution benzidinique de FISKE. Après repos de dix minutes, filtrer sur verre poreux d'Iéna 10 G. 4, sous pression réduite. Nous intercalons entre la trompe à vide et la fiole où se fait le vide, un tube en T, dont la branche restée libre est munie d'un tube de caoutchouc fermé par une pince à vis. Le réglage de l'action du vide par la pince est ainsi très commode,

Laver le bécher avec 2 cm³ acétone à 95 % en volumes en la faisant couler le long des parois, et jeter sur le filtre, avant que la dernière goutte de liquide n'ait passé. Répéter quatre fois ce lavage. Finalement, si on veut, on peut laver une fois à l'alcool-éther. Supprimer l'action du vide, dès que le dernier liquide de lavage est passé.

Porter le filtre 10 G. 4 dans le bécher et verser dans ce dernier 40 à 50 cm³ eau distillée bouillante, amenée par la soude à léger virage rose en présence de phthaléine. Le précipité se désagrège aussitôt. Maintenir le contenu du bécher à l'ébullition et titrer l'acide sulfurique libéré, par la soude N/50 contenue dans une burette de 5 cm³ divisée en 1/100°.

Les plaquettes de précipité s'observant très bien, il est évident qu'on ne saurait arrêter le dosage avant leur disparition totale, même si la liqueur est légèrement rose, car suivant la durée d'action du vide sur le précipité non surmonté de liquide, l'hydrolyse des plaquettes est plus ou moins longue.

VALEUR DE LA METHODE

Théoriquement la quantité de benzidine ajoutée pour 5 cm³ de la solution à doser correspond à une teneur de 1 mgr. 10 de soufre par cm³. Nous avons cherché à déterminer si un excès de solution benzidinique est nécessaire et quelle est l'erreur maximum de la méthode suivant la teneur en soufre de la solution à doser.

Le tableau V nous montre que *le résultat obtenu est toujours entaché d'une légère erreur par excès*, erreur due à l'adsorption de chlorhydrate de benzidine. Toutefois, *cette erreur ne dépasse pas 4 %*, sauf pour les très faibles doses. Quant à l'excès de chlorhydrate de benzidine indispensable, d'après les auteurs, nous voyons que l'addition d'acétone joue le même rôle insolubilisant vis-à-vis du sulfate de benzidine,

Le temps de précipitation n'a pas d'influence sur les résultats, mais il est indispensable que la réaction du milieu soit très bien ajustée, avant d'ajouter le réactif précipitant.

Si on ne peut opérer que sur 5 cm³ de solution, il est très difficile de doser une teneur en soufre inférieure à 0 mgr. 01 par cm³, le précipité étant sensiblement nul. Jusqu'à une

teneur de 0 mgr. 06 de soufre par cm^3 , l'erreur peut atteindre 10 %, pour n'être plus ensuite que de + 4 %.

La dose maxima que l'on peut doser est 1 mgr. de soufre par cm^3 .

Il est évident que si on dispose d'un plus grand volume de solution à titrer, le dosage y gagne en précision, mais pour les solutions de teneur inférieure à 0 mgr. 06 de S. par cm^3 on a avantage à employer la méthode néphélométrique.

TABLEAU V

Teneur de la sol. en mgr de S par cm^3	Volume de soude nécessaire pour titrer directement à l'ébullition 5 cm^3 de la solution		Volume de la même solution de soude, nécessaire pour hydrolyser le sulfate de benzidine obtenu		Erreur o/o	Benzi- dine mise en excès
1,056	3,30	NaOH N/10	3,25	NaOH N/10	-1,5	nul
0,985	3,08	—	3,10	—	+0,6	
0,960	3,00	—	3,08	—	+2,5	
0,864	2,70	—	2,80	—	+3,7	25 %
0,768	2,40	—	2,43	—	+1,25	
0,736	2,30	—	2,38	—	+3,5	
0,640	2,00	—	2,08	—	+4	50 %
0,560	1,75	—	1,75 et 1,77	—	0	75 %
0,490	1,53	—	1,54-1,55-1,56	—	+1	100 %
0,490	1,52	—	1,57	—	+3,5	
0,384	1,21	—	1,23	—	+2	
0,384	1,20	—	1,23	—	+2,5	
0,326	1,02	—	1,03	—	+1	200 %
0,316	4,94	NaOH N/50	5,14	NaOH N/50	+4	
0,315	4,93	—	4,96	—	0	
0,310	4,86	—	5,03	—	+3,5	
0,262	4,09	—	4,24	—	+4	
0,246	3,85	—	3,96	—	+3	
0,206	3,22	—	3,37	—	+4	
0,191	2,97	—	3,13	—	+5	
0,185	2,91	—	3,00	—	+3	
0,131	2,04	—	2,14	—	+5	
0,064	1,00	—	1,02	—	+2	
0,059	0,93	—	0,96	—	+3	
0,048	0,76	—	0,83-0,78	—	+9	300 %
0,048	0,74	—	0,80	—	+8	
0,044	0,69	—	0,63	—	-9	
0,038	0,59	—	0,59-0,60	—	+1	
0,036	0,57	—	0,62	—	+5	
0,028	0,44	—	0,46-0,42	—	+4	
0,019	0,30	—	0,32	—	+6	
0,009	0,14	—	0,16	—	+15	

TROISIEME PARTIE

DOSAGE DU SOUFRE DU SANG

Si le dosage du soufre urinaire est pratiqué depuis de nombreuses années, le dosage du soufre sanguin (thiémie) n'est demandé que depuis les publications de M. LOEPER et ses élèves (55-56), qui ont montré que le foie et les surrénales jouent un rôle important dans l'équilibre thiémique.

M. LOEPER a même émis l'hypothèse que « la mélanodermie, qui est due au dépôt d'une substance aminée soufrée, la mélanine, peut dépendre de l'excès de soufre du sang, et que les hépatiques et surrénaux sont pigmentés en partie pour cette raison que leur sang contient un excès de soufre non oxydé. »

Cette théorie est combattue par F. SCHAEF (83), qui a confirmé les travaux de H. STANLEY RAPER (74) sur la constitution de la mélanine, dont la teneur en soufre, dit l'auteur « est à attribuer très probablement à des impuretés riches en soufre, celui-ci n'étant pas en tout cas, un élément essentiel du pigment. »

Quoi qu'il en soit, le dosage du soufre sanguin doit présenter un réel intérêt, mais encore faut-il posséder une méthode sûre, et si les auteurs diffèrent tant dans leurs résultats, ceci tient peut-être à des techniques défectueuses.

Nous rapportons dans le chapitre VI, les modes de désalbumination, d'oxydation et d'hydrolyse, et les techniques des différents auteurs. Puis, après avoir étudié deux procédés d'oxydation en milieu liquide, nous exposons dans le chapitre VII le résultat de nos recherches, sur le dosage des différentes formes du soufre sanguin.

CHAPITRE VI

EXPOSE DES DIFFERENTES TECHNIQUES UTILISEES JUSQU'ICI POUR LE DOSAGE DU SOUFRE SANGUIN

De la déprotéinisation

Les premiers auteurs ont eu recours à l'ultra-filtration, procédé peu praticable dans un laboratoire courant d'analyses biologiques.

Deux procédés ont seulement été utilisés, la désalbumination par l'acide acétique et la chaleur et la désalbumination par l'acide trichloracétique. Mme POHORECKA-LESLEZ, puis MM. A. LESURE et A. DUNEZ n'ont pu employer ce dernier réactif « qui donne avec la benzidine un sel dont on ne peut se débarrasser que par épuisement à l'éther ». Dans leurs dernières publications, MM. A. LESURE et A. DUNEZ indiquent le mode opératoire suivant à l'acide acétique : « 10 cm³ de sérum sont dilués avec 4 à 5 fois leur volume d'acide acétique N/100. On porte au bain-marie bouillant une demi-heure. Le liquide surnageant ne doit plus précipiter par l'acide trichloracétique. Neutraliser par deux gouttes de soude, et compléter à 100 cm³, puis filtrer. Si la désalbumination n'est pas complète, ce dont on s'aperçoit par l'essai à l'acide trichloracétique, ajouter au filtrat 1 pour 100 d'acide acétique pur cristallisable, et recommencer le filtrage comme précédemment. Dans certains cas, où ce deuxième traitement se montre encore insuffisant, ajouter 1 cm³ à 1 cm³ 5 acide trichloracétique à 20 % et filtrer de nouveau après précipitation. »

Avant d'adopter l'acide trichloracétique DENIS et Mlle REED firent l'étude critique des différents défécants usuels.

1° L'acide picrique renferme toujours des sulfates même après plusieurs cristallisations.

2° $HgCl^2 + HCl$ donnent des résultats invariablement faibles (BROWINSKI attribue ce fait à ce que ce mode de défécation précipite toutes les protéines et leurs produits de désintégration, notamment, les acides oxyprotéiques qui renferment du soufre neutre).

3° Acide acétique et Chaleur. — Laisse toujours de petites quantités de protéines qui interviennent dans la précipitation du SO^4Ba . Cette défécation, qui est toujours très laborieuse, nécessite la présence de sels (KCl par exemple) (1).

4° Inutile de songer à employer les réactifs phosphomolydiques ou phosphotungstiques ou métaphosphoriques, qui introduiraient du phosphore, toujours gênant par la suite dans le dosage, parce que pouvant précipiter sous forme de phosphates en même temps que les sulfates.

5° Il ne faut pas songer non plus à utiliser des substances colloïdales qui absorbent une grande partie des sulfates.

6° Reste l'acide trichloracétique qui, d'après les auteurs, est le défécant de choix.

Des modes d'oxydation utilisés pour le dosage du soufre total non protéique

Pour doser le soufre total dans la terre, les minéraux, les végétaux, les organes, on a eu recours à des procédés d'oxydation très énergiques par voies sèche ou humide :

Fusion au peroxyde de sodium de MODRAKOWSKI (63) ;

Oxydation par le carbonate de soude et courant d'oxygène pur à haute température de HINGLAIS (33).

Oxydation par le mélange carbonate de soude, nitrate de

(1) BENEDICT [7] enlève les traces de protéines que laisse ce mode de défécation par un traitement à l'aide d'une solution colloïdale de fer.

soude, acide azotique fumant de G. BERTRAND et L. SILBERSTEIN (8).

Oxydation par les acides azotique et perchlorique de LEMATTE, BOINOT et KAHANE (50).

On a utilisé, pour le dosage du soufre total non protéique du sang, des procédés plus doux.

H. L. WHITTE réalise l'oxydation uniquement par l'emploi de l'acide azotique.

Mme POHORECKA-LESLEZ a pratiqué les méthodes ci-après, et elle conclut que si on emploie ensuite la méthode de dosage à la benzidine :

1° La méthode de MODRAKOWSKI doit être rejetée, car la
« présence de NaCl obtenu après évaporation du liquide aci-
« difié par HCl, dissout la petite quantité de sulfate de benzi-
« dine obtenue.

« 2° La méthode de fusion au carbonate de soude et nitrate
« de potasse amène la formation de nitrites et de peroxydes
« alcalins qui oxydent et diazotent la benzidine, d'où une pré-
« cipitation imparfaite du sulfate de benzidine. »

Elle a fait ensuite une étude comparative des trois méthodes d'oxydation ci-dessous, par rapport à la méthode type de MODRAKOWSKI, le dosage du soufre étant fait à l'état de SO^4Ba par microméthode gravimétrique.

a) *Méthode de Bénédict.* — Evaporer à sec, dans une capsule de porcelaine, le liquide à analyser avec 0 cm³ 2 à 0 cm³ 3 du réactif de l'auteur (nitrate de cuivre cristallisé 20 gr. chlorate de potasse 5 gr. eau distillée q. p. s. 100 cm³), puis chauffer vingt minutes au rouge sombre. Après refroidissement, ajouter 1 cm³ HCl 3 N et évaporer à sec au bain-marie. Dissoudre dans 5 cm³ d'eau et filtrer pour séparer la silice.

b) *Méthode de Wolf et Osterberg.* — Modification de la précédente méthode. Le liquide est traité auparavant par l'acide azotique concentré (3 cm³ pour 5 cm³ liquide à doser), puis chauffé au bain-marie jusqu'à disparition des vapeurs nitreuses, ensuite traité selon la méthode de BÉNEDICT.

c) *Méthode d'oxydation par voie humide à l'acide azotique concentré et perhydrol* qui fut utilisé pour doser

l'arsenic, le chlore, le soufre dans les corps organiques par MM. de MYTTENAERE (66), P. B. REHBERG (77), A. LEULLIER et FOUILLOUZE (53). Le liquide évaporé au bain-marie dans un bécher recouvert d'un verre de montre est additionné de 2 à 3 cm³ d'acide azotique concentré. On chauffe jusqu'à disparition des vapeurs nitreuses, puis on prolonge l'attaque par l'addition, faite goutte à goutte, de 3 à 5 cm³ de perhydrol en chauffant doucement. Le liquide limpide et incolore est évaporé au bain-marie, et le résidu additionné d'HCl concentré est évaporé à nouveau à sec pour se débarrasser des azotates. Le résidu dissous dans l'eau est prêt à être dosé.

L'auteur signale que « quelle que soit la méthode d'oxydation employée, il est bon d'éliminer, au préalable, le calcium qui, pendant l'oxydation, donne du SO⁴Ca qui n'entrera plus en réaction avec la benzidine, et diminuera d'autant le taux du soufre total. Quant aux meilleurs résultats, ils sont obtenus par la méthode au perhydrol ».

MM. A LESURE et A. DUNEZ (51) ont adopté le mode préconisé par Mme POHORECKA-LESLEZ, en employant toutefois de l'acide azotique fumant au lieu d'acide concentré. KONRAD-LANG (48) utilise le même mode pour doser le soufre total du sérum non déprotéïnisé (0 cm³ 5 sérum sont additionnés de 2 cm³ acide azotique fumant; on chauffe doucement en ajoutant goutte à goutte jusqu'à 10 cm³ de perhydrol environ, puis on calcine à sec.)

DENIS et Mlle REED utilisent un mode d'oxydation identique à celui de BENEDICT. Evaporer à sec dans un large Pyrex le mélange (filtrat trichloracétique 5 à 10 cm³, mélange oxydant 1 cm³), et continuer à chauffer à flamme libre jusqu'à cessation de vapeurs. Dissoudre le résidu dans HCl N. Leur mélange oxydant est le suivant :

(NO ³) ² Zn	25 gr.
ClNa	25 gr.
ClAm	10 gr.
Eau distillée.....	100 gr.

Ils ont obtenu par la méthode pondérale, précipitation à froid du SO⁴Ba, des résultats meilleurs qu'en employant le réactif de BENEDICT, qui ne peut être utilisé dans la méthode

néphélémétrique, parce que renfermant du cuivre qui donne lieu à une production de couleur bleue qui rend inexactes les lectures.

Y. KAMBAYASHI (41) pour doser le soufre dans la rate, calcine d'abord avec le mélange nitrate de potasse, acide azotique, puis avec le réactif de DENIS et Mlle REED.

KONARSKY (45), dose le soufre total des urines et des organes après oxydation, par le réactif de BENEDICT, puis pesée du SO^4Ba .

Modes d'hydrolyse utilisés pour le dosage des sulfoconjugués

Le soufre du sang existerait sous trois formes; soufre des sulfates, soufre des sulfoconjugués, soufre neutre. On dose d'une part le soufre des sulfates, puis le soufre oxydé total après hydrolyse des sulfoconjugués, et enfin, le soufre total. La différence (S oxydé total — S sulfates), exprime le S des sulfoconjugués et la différence (S total — S oxydé total), le soufre neutre.

Des sulfoconjugués. — E. BAUMANN (4) et E. SALKOWSKI (82) sont les premiers qui aient étudié les éthers sulfuriques des phénols. Ce sont des corps très stables, qui résistent à l'action des alcalis, qui ne sont pas décomposés par la putréfaction et dont la conservation est excellente en milieu neutre et même en solution acide organique. Ils sont décomposés en solution aqueuse en phénol et sulfate acide alcalin, par les acides minéraux forts, et à chaud en quelques minutes, par l'acide chlorhydrique dilué. Avec l'acide acétique dilué, cette hydrolyse est réalisée peu à peu par chauffage prolongé, mais elle n'a pas lieu dans le cas de l'urine, par suite de l'action protectrice des sels que renferme celle-ci.

C. NEUBERG et ses élèves (67-68-69-70-71-79-95), ont découvert et étudié une diastase, la *Sulfatase*, capable d'hydrolyser les phénylsulfates. Fournie par une sorte d'*Aspergillus*

oryzæ, elle se trouve dans la takadiastase du Japon, et à peu près partout dans l'organisme humain (foie, muscles, reins, cerveau). Elle peut être mise en évidence dans l'organe frais ou sec, ou dans l'extrait aqueux de l'organe.

BAUMANN a montré que le phénol ingéré est éliminé sous forme de phénylsulfate dans les urines. Par analogie, on a conclu que les phénols, le scatol, l'indol, corps nocifs, parce que solubles dans les lipides, et ayant pour origine l'absorption intestinale ou le travail musculaire, sont neutralisés par combinaison avec l'ion SO_4 pour donner des phénylsulfates insolubles dans les lipides, donc moins toxiques. Cette conjugaison d'après l'école de C. NEUBERG se ferait surtout dans le foie et dans les muscles, et l'élimination des phénylsulfates formés se ferait par les urines. De même S. MORGULIS (65) étudiant les variations des sulfoconjugués dans les urines de chiens jeûneurs, pense qu'ils ont avant tout leur origine dans le métabolisme.

La plupart des auteurs dosent le soufre oxydé total du sang sans déterminer la part qui revient aux sulfoconjugués, certains même, tel BROWINSKI, n'en trouvent pas dans le sérum de cheval, et d'autres tels MM. A. LESURE et A. DUNEZ n'en trouvent que des traces dans le sérum humain. HEUBNER et MEYER BISCH en 1921, ont été les premiers à signaler la présence de sulfoconjugués dans le sérum humain. Si KAHN et POSTMONTIER en 1925 (40), croient à leur existence, il faut arriver à DENIS et Mlle REED en 1926, pour en avoir un dosage séparé.

Tous les auteurs hydrolysent les sulfoconjugués à l'aide de l'acide chlorhydrique, mais dans des conditions parfois très différentes. Ainsi DENIS et Mlle REED opèrent à feu nu, mais peu vif, MM. A. LESURE et A. DUNEZ à l'ébullition, WAKEFIELD au bain-marie. Pour un même volume correspondant à 1 cm³ sérum, alors que MM. A. LESURE et A. DUNEZ emploient 1 cm³ d'acide concentré, les autres auteurs n'en utilisent que 2 gouttes.

TECHNIQUES DE DOSAGES DES DIFFERENTS AUTEURS

Méthodes au sulfate de baryte

1° Technique de Denis et Mlle Reed.

	Sérum ou sang total.....	1 volume
a) Désalbumination	Eau distillée.....	2,2 —
	Acide trichloracétique à 20 %	0,8 —

b) *Dosage des sulfates.* — Préparer en même temps le tube témoin et le tube de dosage :

	Tube de dosage	Tube témoin
Filtrat trichloracétique.....	25 cm ³	
HCl N/10		25 cm ³
NaOH 0, 6N.....	4 cm ³	3 cm ³
Solution de S à 0 mgr. 05 par cm ³ ..		1 cm ³
Solution de gélatine à 5 %.....	1 cm ³	1 cm ³
Solution de Cl ² Ba à 5 %.....	1 cm ³	1 cm ³

Comparer après quinze minutes les troubles obtenus.

c) *Dosage du soufre oxydé total.* — Evaporer dans un large Pyrex (200 × 20) chauffé par un microbrûleur jusqu'à un taux tel que des particules solides commencent à se déposer, le mélange .

Filtrat trichloracétique.....	15 cm ³
HCl N.....	4 cm ³

La durée d'évaporation doit être inférieure à 15 à 20 minutes. Evidemment, les derniers cm³ sont évaporés avec beaucoup de soin, pour éviter la production anormale d'une coloration. Au résidu, ajouter :

Eau distillée.....	15 cm ³
NaOH 0,6 N.....	2 cm ³
Solution de gélatine à 5 %.....	1 cm ³
Solution de Cl ² Ba à 1 %.....	5 cm ³

et comparer avec 1 cm³ de solution étalon à 0 mgr. 05 de soufre par cm³, ayant subi tous les mêmes traitements.

d) *Dosage du soufre total.* — Evaporer à sec dans un large Pyrex (200 × 20) le mélange :

Filtrat trichloracétique.....	5 à 10 cm ³
Mélange oxydant.....	1 cm ³

et continuer à chauffer à flamme libre jusqu'à cessation de vapeurs. Dissoudre le résidu dans :

HCl N.....	2 cm ³
Eau distillée.....	15 cm ³
et ajouter Solution de gélatine à 5 %.....	1 cm ³
Solution de Cl ² Ba à 1 %.....	5 cm ³

comparer avec la solution étalon à 0 mgr. 10 de soufre par cm³ identiquement traitée.

2° Technique de Konrad Lang.

Dosage du soufre total du sérum sans désalbumination.

La destruction de la matière organique a lieu à l'aide de l'acide azotique fumant et du perhydrol, suivie de calcination. Le produit de calcination de 0 cm³ 5 de sérum est repris par une solution de chromate de baryum N/100 à volume final égal à 10 cm³. Quand le SO⁴Ba commence à déposer, ajouter Ca(OH)² chimiquement pur. Bien mélanger et, après cinq minutes, centrifuger ou filtrer. A 1 cm³ du liquide clair ajouter 10 cm³ d'eau et 1 cm³ du réactif à la diphénylcarbazine, puis bien mélanger. Comparer la coloration rouge violette au colorimètre au bout de vingt minutes avec celle donnée par une solution titrée identiquement traitée. Ne pas attendre davantage pour faire la lecture, car la diphénylcarbazine est rendue peu à peu incolore par l'acide azotique provenant de la calcination.

Méthodes au sulfate de benzidine

Elles dérivent toutes de celle que FISKE a publiée pour le dosage du soufre urinaire.

3° Technique de H.-L. Whitte.

	Sérum	1 volume
a) Désalbumination	Eau distillée.....	3 —
	Acide trichloracétique à 20 %.	1 —

b) *Dosage du soufre total.* — Dans un bécher de 100 cm³, 10 à 15 cm³ de filtrat trichloracétique sont additionnés de 2 cm³ acide azotique concentré, puis évaporés sous la hotte sans ébullition. Avant le charbonnement, ajouter à nouveau 2 cm³ acide azotique et évaporer à sec. Répéter trois ou quatre fois ce traitement suivant la quantité de constituants organiques non protéiques du filtrat, puis chauffer plus fort pour faire les cendres durant 10 minutes. A la solution de cendres (10 cm³), ajouter, dans un bécher de 100 cm³, deux gouttes de méthylorange puis HCl N jusqu'à virage rouge, et enfin 2 cm³ solution benzidinique de FISKE. Après un repos de quelques minutes, ajouter 4 cm³ d'acétone à 95 %. Le précipité recueilli est hydrolysé et l'acide sulfurique libéré est titré par la soude en présence de rouge de phénol. Dosant le soufre dans le sérum du chien, l'auteur trouva par la première méthode de DENIS des doses si faibles qu'il ne put faire de lectures néphélométriques, et il en conclut que la teneur en soufre pour 100 cm³ de sérum était inférieure à 0 mgr. 5. Il appliqua sa méthode pour doser le soufre du sérum après injections de solutions de sulfates (pures ou renfermant, en outre, des phosphates par exemple), pour en étudier l'élimination par rapport à celles des autres éléments et il ne fit aucune tentative pour déterminer autre chose que le soufre des sulfates. Si le sang contient un excès de phosphates, il les élimine comme suit. La solution de cendres est mise dans un tube jaugé de 12 cm³ et il ajoute :

Ammoniaque concentré.....	1 goutte
Chlorhydrate d'ammoniaque à 5 %.....	1 cm ³
Carbonate de magnésie finement pulvérisé.....	0 gr. 10
Eau distillée q.s.p.....	12 cm ³

Après une minute d'agitation, il filtre sur papier filtre sans plis de 7 mm. et il opère le dosage du soufre sur 10 cm³ filtrat.

4° Technique de S. R. Hubbard, modifiée par E. G. Wakefield.

a) *Désalbumination*. — Elle est identique à celle de H. L. WHITTE.

b) *Dosage des sulfates*. — Dans un tube à centrifuger bouché, pour éviter toute évaporation, mesurer 5 cm³ de filtrat et 10 cm³ solution à 0,5 % de benzidine base dans l'acétone pure. Après une repos de trente minutes, centrifuger trente minutes à 3.000 tours p.m. Le liquide surnageant est rejeté et le tube est renversé sur un papier filtre sec pendant trois minutes. Le précipité est remis en suspension dans 15 cm³ acétone pure à l'aide d'un agitateur très pointu et rodé. On centrifuge à nouveau durant quinze minutes. Le liquide surnageant ayant été rejeté, le tube est remis cinq minutes sur le papier filtre. Les bords du tube sont finalement séchés au papier filtre. Le précipité est dissous dans 2 cm³ HCl N/5 par agitation à douce température (si on chauffe, le tube sera refroidi avant de continuer). Ajouter alors :

Eau distillée.....	6 cm ³
Solution diluée à 1/5 au moment de l'emploi, d'eau oxygénée commerciale.....	1 cm ³
Solution à 0,5 % de perchlorure de fer (préparée chaque semaine	1 cm ³

Mélanger et laisser reposer cinq minutes. A ce moment, la coloration est complètement développée et reste stable durant encore cinq minutes. Comparer avec les solutions étalons de même acidité chlorhydrique, et préparées en même temps que la solution à doser. (Les solutions étalons à 0 mgr. 015, 0 mgr. 03, 0 mgr. 15 de sulfates par cm³ sont préparées par dilution avec HCl N/5 de la solution mère ci-après dont 1 cm³ correspond à 1 mgr. de sulfate de benzidine :

Chlorhydrate de benzidine....	2 gr. 0075
HCl N/5.....	500 cm ³

Si on ne peut lire les colorations dans les 5 minutes, ajouter 0 cm³ 5 HCl concentré aux solutions témoins et à doser, la disparition rapide de la coloration sera empêchée:

c) *Dosage du soufre oxydé total.* — Le tube à centrifuger renfermant 5 cm³ filtrat et additionné de deux gouttes HCl concentré est porté quinze minutes dans un vase à eau bouillante. Après refroidissement, le dosage se poursuit comme plus haut. Le dosage du soufre total n'est pas indiqué.

5° Technique de M^{me} Pohorecka-Leslez.

a) *Désalbumination* par l'acide acétique N/100 et la chaleur.

b) *Dosage des sulfates.* — 50 cm³ filtrat, correspondant à 5 cm³ de sérum sont évaporés à sec dans une capsule en verre. Le précipité est repris par l'alcool à 96° au bain-marie pour dissoudre la plupart des corps organiques qui gênent la réaction benzidinique. La liqueur alcoolique est filtrée et rejetée. La capsule et le filtre sont traités par de l'eau chaude jusqu'à concurrence de 10 cm³ de filtrat. A ces 10 cm³, ajouter deux gouttes de bleu de bromophénol à 0,04 % et HCl goutte à goutte à coloration jaune, puis 2 cm³ liqueur benzidinique de FISKE, et après deux minutes 4 cm³ acétone à 95 %. Après repos de dix minutes, filtrer sous pression réduite, sur filtre en verre poreux d'Iéna pour microanalyses, laver par trois fois avec 1 cm³ acétone à 95 % et titrer selon FISKE en présence de rouge du phénol à 0,05 % (deux gouttes).

6° Technique de MM. A. Lesure et A. Dunez.

Ils ont peu modifié le mode opératoire précédent. Au lieu du virage jaune du bleu de bromophénol qui a lieu pour pH 3 ils utilisent le virage jaune du bleu de bromothymol qui a lieu pour pH 6 et ils ajoutent, dans tous les cas, 2 cm³ HCl 1/10 avant de précipiter par 4 cm³ de leur liqueur benzidinique.

Ils hydrolisent par 5 cm³ HCl 1/10, 5 cm³ de filtrat durant quinze minutes d'ébullition et poursuivent le dosage du soufre oxydé total identiquement à celui des sulfates (dessiccation, traitement à l'alcool, etc.).

Le dosage du soufre total a été vu lors de l'étude des méthodes d'oxydation.

CHAPITRE VII

RECHERCHES PERSONNELLES SUR LE DOSAGE DU SOUFRE SANGUIN TECHNIQUES PROPOSEES

1) De la méthode d'oxydation à employer pour le dosage du soufre total

MM. L. LEMATTE, G. BOINOT et E. KAHANE (50) ont montré que le mode de destruction par calcination pour le dosage du soufre contenu dans les principaux organes utilisés en opothérapie devait être abandonné, tout le soufre lié à l'azote disparaissant au cours de la calcination. Ils obtiennent, au contraire, d'excellents résultats en dissolvant la substance dans un solvant approprié et en oxydant la matière organique par le mélange :

Acide nitrique fumant ($D=1,49$).....	100 cm ³
Acide perchlorique ($D=1,615$).....	50 cm ³

M. Raoul M. MAY a adopté leur méthode pour doser le soufre et le phosphore dans les hémisphères cérébraux, tous les modes d'oxydation étudiés par Mme POHORECKA-LESLEZ étant insuffisants de même que le chauffage à sec et la fusion au Na^2O^2 de MODRAKOWSKI.

Nous pratiquons leur mode de destruction dans un ballon de Kjeldahl en Pyrex de 60 cm³. A 1 cm³ (1): sang 1/2, sérum, globes 1/3 ou à 10 cm³ de filtrat trichloracétique au demi correspondant, ajouter 3 cm³ d'acide nitrique fumant et 1 cm³ d'acide perchlorique. Après cinq minutes de contact, chauffer

(1) La destruction est encore complète si on opère sur 2 cm³, mais elle ne l'est plus si on opère sur 3 cm³.

avec précaution jusqu'à ce que la solution soit incolore, puis poursuivre le chauffage jusqu'à départ à peu près total de l'acide perchlorique, c'est-à-dire jusqu'à presque complète évaporation du liquide du ballon.

Nous avons pratiqué aussi le mode de destruction à l'acide azotique fumant et perhydrol. La prise d'essai identique à celle du cas précédent est additionnée de 3 cm³ acide azotique fumant, puis, après départ des vapeurs nitreuses, à l'ébullition, de perhydrol goutte à goutte (environ 3 cm³) jusqu'à ce qu'il ne se dégage plus de vapeurs nitreuses et qu'on obtienne un liquide incolore. Puis, ici encore, nous évaporons presque à sec.

Il est évident qu'il faut tout d'abord s'assurer que les réactifs employés ne renferment pas de soufre, notamment l'acide perchlorique et surtout le perhydrol, parfois stabilisé à l'aide de l'H²SO⁴ (1).

Un dosage à blanc pour chaque mode de destruction et pour chaque série nouvelle de réactifs doit toujours être fait. S'il arrive que les différents réactifs employés dans les mêmes proportions que dans les dosages renferment un peu de soufre, il faudra introduire une correction déterminée dans le dosage à blanc.

Bien que la destruction soit terminée dès que le liquide est incolore, le milieu obtenu est beaucoup trop acide pour se prêter, même après avoir complété à 10 cm³, à une lecture néphélométrique correcte. Ci-dessous quelques valeurs de densités optiques obtenues en milieu perchlorique, par exemple :

Teneur du milieu en acide perchlorique de D=1,615	Valeur des densités optiques suivant la teneur en mgr. de S par cm ³ de solution				
	0,005	0,01	0,015	0,020	0,025
1/10	0	0	2	7	24
1/20	0	10	25	38	43
1/40	7	18	30	31	49
0 (sol. dans eau distillée)	9	18	26	37	46

Les proportions sont de 5 cm³ de solution de S pour 1 cm³ de solution « gélatine chlorure de baryum N° II ».

(1) Le perhydrol renferme, en outre, très souvent, du phosphore.

En évaporant presque à sec, l'acidité de la solution obtenue après volume complété à 10 cm³ avec de l'eau distillée est assez faible et permet de bonnes lectures, comparables à celles qu'on a en solution aqueuse de pH 3.

Toutefois, pour éviter toute erreur pouvant provenir des différences d'acidité dues à des évaporations plus ou moins poussées, nous reprenons le résidu de destruction par de très faibles volumes d'eau distillée, que nous versons ensuite dans une fiole jaugée de 10 cm³ renfermant déjà 1 cm³ de NaOH N. Nous complétons toujours avec les eaux de lavage jusqu'à volume total de 10 cm³. Sur 2 cm³ nous déterminons avec soin, en présence de bleu de bromophénol, la quantité de soude N/10 nécessaire pour obtenir un léger virage bleu. Aux 8 cm³ restant dans le ballon, nous ajoutons la quantité voulue de soude N, moins 1/10^e de cm³, et nous complétons avec de l'eau distillée jusqu'au trait 10 cm³. La solution a un pH voisin de 2 et se trouve diluée du quart de son volume.

Ci-après les résultats obtenus selon les deux modes de destruction sur :

Essai 1. — Evaporation de 3 cm³ acide azotique fumant.

Essai 2. — Evaporation de 3 cm³ acide azotique fumant + 1 cm³ acide perchlorique.

Essai 3. — Evaporation de 3 cm³ acide azotique fumant + 1 cm³ acide perchlorique + 5 cm³ sol. de S à 0 mgr. 05 par cm³.

Essai 4. — Evaporation de 3 cm³ acide azotique fumant + 3 cm³ perhydrol.

Essai 5. — Evaporation de 3 cm³ acide azotique fumant + 3 cm³ perhydrol + 5 cm³ sol. de S à 0 mgr. 05 par cm³.

Chaque essai a été additionné de 1 cm³ NaOH N/50, de façon à avoir toujours un excès de base.

Le résidu d'évaporation de chaque essai est repris comme plus haut et le dosage du soufre par néphélémétrie est pratiqué en prenant toujours les proportions : 5 cm³ de solution à doser et 1 cm³ de solution « gélatine chlorure de baryum

n° II ». Les valeurs de densité optique trouvées sont reportées dans le tableau ci-dessous :

Essai	1	2	3	4	5	Sol. de S. à 0 mgr. 025
D. O.	0-0-0	4-4-6	52-54-53	0-1-0-0	53-54-50	51-52

Seul l'acide perchlorique renferme un peu de soufre, qu'on retrouve sensiblement surajouté à la quantité de soufre connue et à doser.

De même, dans la méthode benzidinique, on a intérêt à éliminer le maximum d'acide libre et de continuer le chauffage presque jusqu'à dessiccation. On a ainsi moins de soude à ajouter, donc, moins grande formation de perchlorates ou de nitrates et la solution, après neutralisation, se trouve moins diluée. En opérant de la sorte, avec des solutions titrées de soufre, nous n'avons jamais eu aucun rôle perturbateur qu'aurait peut-être pu jouer un grand excès de perchlorates ou de nitrates.

Le résidu de destruction est additionné de 1 cm³ eau distillée, 3 gouttes bleu de bromophénol et de soude N jusqu'à virage bleu. On revient à un pH légèrement inférieur à 3 avec de l'HCl N/10. On ajoute 8 cm³ acétone pure et 2 cm³ solution benzidinique de Fiske, et on continue le dosage comme d'habitude.

Aussi bien par la méthode néphélométrique que par la méthode à la benzidine, les deux modes de destruction nous ont paru de valeur égale. Nous rappelons, en outre, que MM. A. LEULLIER et FOUILLOUZE (53), pratiquant le mode de destruction à l'acide azotique et perhydrol, ont trouvé des résultats identiques, qu'ils pratiquent ensuite le dosage du soufre à la benzidine ou au sulfate de baryte.

Quant à nous, nous préférons utiliser la destruction nitro-perchlorique à la destruction acide azotique-perhydrol, surtout quand il s'agit de détruire du sérum ou du sang non déprotéinisés. Elle nécessite, en effet, moins d'interventions de la part de l'opérateur et elle est plus rapide, s'effectuant en quinze minutes tout au plus.

Nous préférons aussi la méthode néphélométrique de dosage

des sulfates à la méthode benzidinique. Nous verrons (p. 93) qu'elle seule nous permet de doser les sulfates libres, et que par elle seule le dosage du soufre total non protéique sur de faibles volumes de sang est possible. Elle est, en outre, rapide et précise.

2) De la désalbumination

Nous avons vu que seuls deux procédés ont été utilisés.

Procédé à l'acide acétique et chaleur. — Comme l'ont décrit DENIS et Mlle REED, ce procédé est défectueux. MM. A. LESURE et A. DUNEZ qui l'emploient se voient obligés, dans la plupart des cas, d'achever leur désalbumination par quelques gouttes d'acide trichloracétique. Quand ils ne traitent pas par ce dernier acide, ils sont obligés, disent-ils, de reprendre le filtrat acétique desséché par l'alcool à 96°, pour pouvoir précipiter les sulfates. Ce faisant, les auteurs signalent qu'ils ont parfois eu des pertes de soufre, soufre qu'ils ont retrouvé dans le précipité alcoolique.

La désalbumination, que l'on pratique sur 10 cm³ sérum, peut nécessiter deux ou trois filtrations, et il en résulte que le titre de la dilution n'est pas exactement du dixième, quand on complète seulement en fin de compte au volume de 100 cm³, les précipités dus à l'acide acétique et à l'acide trichloracétique retenant toujours du liquide filtré.

Procédé à l'acide trichloracétique. — Cet acide n'hydrolyse pas de protéines et un excès n'en redissout pas. Le filtrat obtenu est privé de protéines et renferme les acides aminés et les acides oxyprotéiques. Comme nous le verrons, le mode de défécation est simple, rapide et fidèle.

Inconvénients. — 1° A chaud avec Cl²Ba, il donne du trichloracétate de baryte. BROWNSKI, dans des essais préliminaires, détermine les corrections à apporter dans les dosages faits après précipitation à chaud du SO⁴Ba sur le filtrat. A froid, cet écueil est évité et l'examen du tableau III, page 59 nous montre que, dans la méthode néphélométrique, il n'intervient pas.

2° Quant au précipité qu'il peut donner dans la méthode à la benzidine, avec celle-ci nous l'évitons par l'addition préalable à la solution à précipiter, soit d'acétone, soit d'alcool éther. Ces solvants non seulement empêchent la formation de trichloracétate de benzidine, mais le redissolvent. Ici encore, il n'intervient donc pas dans les dosages. WHITTE, d'une part, STADIE et ROSS, d'autre part, défèquent bien à l'acide trichloracétique, mais ils n'ont pas eu à combattre ce dernier écueil, car, avant de faire la précipitation selon FISKE, ils détruisent la matière organique, donc l'acide trichloracétique.

Autres procédés. — La défécation à l'acide tungstique n'a pas été utilisée. BEAUDOIN (6) signale qu'on ne précipite par ce mode rien en dehors des albumines, et notamment que les corps sulfurés ne sont pas éliminés. Outre qu'il faut partir d'un tungstate très pur préparé par la méthode FOLIN à l'alcool, il est évidemment nécessaire de remplacer l'acide sulfurique par l'acide chlorhydrique. Ce mode de défécation ne peut convenir dans la méthode néphélométrique, car l'acide tungstique précipite la solution «gélatine chlorure de baryum » et rend toute lecture impossible.

La précipitation des albumines à l'acétone ou à l'alcool n'a pas été utilisée non plus.

De même que dans le cas du dosage de l'azote non protéique, l'acide trichloracétique reste donc le défécant de choix.

Dans toute déprotéinisation, le coagulum formé peut, par adsorption, créer des erreurs, erreurs qu'on peut diminuer, s'il y a lieu, par dilution préalable du liquide à désalbuminer. ROCHE (78) dit que le laquage du sang est indispensable avant désalbumination pour le dosage du phosphore, si l'on ne veut pas entraîner, dans les protéines, des combinaisons organiques phosphorées. Peut-être en est-il de même dans le cas du soufre; toutefois, il faut se souvenir que la teneur en sulfates libres du sang est faible et que toute dilution risque d'en rendre encore plus difficile la détermination.

Pour le dosage des bases totales, et les conditions peuvent être très différentes, il est vrai, STADIE et ROSS (86) emploient 5 grammes d'acide trichloracétique pour précipiter 1 gramme de protéines. Ils considèrent que la teneur en protéines est de

10 % dans le sérum, 20 % dans le sang, et 30 % dans les globules.

Ils conseillent, en outre, les concentrations suivantes en poids :

Initiale	Finale
—	—
Acide trichloracétique 10 %	5 %
Protéines	1 %

Pour le dosage de l'azote total non protéique, CRISTOL (18-19) conseille la technique de MOOG classique, mais en ayant soin de diluer le sang total de moitié et les globules au tiers, si on opère sur ceux-ci. « L'hémolyse étant totale, les erreurs de mesure, dit-il, sont bien moindres; le désalbuminant, agissant sur des hématies éclatées, fait un coagulum uni- forme qui ne risque pas d'emprisonner des composés azotés dans des hématies intactes simplement entourées d'une coque solide, comme cela peut être le cas dans les procédés anciens, et enfin la teneur en protéines doit, dans tous les cas, être approximativement égale. »

Le même auteur, au sujet de l'acidité optima pour la désalbumination, conclut qu'on obtient les chiffres les plus forts en azote dans le filtrat pour les titres d'acide trichloracétique 8 et 50 % et le taux minimum pour le titre 20 %. Suivant l'acidité du milieu, il y a précipitation ou absorption par le coagulum de substances azotées colloïdales.

En adoptant la teneur en protéines indiquée par STADIE et ROSS, le tableau de défécation des différents auteurs est donc le suivant pour une prise d'essai de 1 cm³ de liquide à désalbuminer :

Méthode de	Sérum				Sang total				Globules			
	Eau dist.	Sol. à 20 o/o Ac. Trichl.	Vol. final	Valeur du rapport Ac. Trichl. aux Protéines	Eau dist.	Sol. à 20 o/o Ac. Trichl.	Vol. final	Valeur du rapport Ac. Trichl. aux Protéines	Eau dist.	Sol. à 20 o/o Ac. Trichl.	Vol. final	Valeur du rapport Ac. Trichl. aux Protéines
Denis et M ^{lle} Reed	2,2	08,	4	1,6	2,2	0,8	4	0,8				
Wakefield	3	1	5	2	3	1	5	1				
Stadie et Ross....	6,5	2,5	10	5	14	5	20	5	21,7	7,5	30	5
Cristol		1	2	2	1	2	4	2	2	3	6	2

Evidemment, il faut vérifier la pureté de l'acide trichloracétique et, pour l'obtenir sûrement exempt de soufre, il n'y a qu'à le redistiller dans le vide sous pression de 10 à 20 mm. (WAKEFIELD l'additionne au préalable de 5 % de solution à 0,5 % de benzidine base dans l'acétone.)

Quel mode de désalbumination à l'acide trichloracétique faut-il adopter pour le dosage du soufre total non protéique du sérum? — Deux mélanges de sérums normaux ont été désalbuminés, selon les quatre modes suivants :

Volumes	1	2	3	4
—	—	—	—	—
Sérum	1	1	1	1
Solution à 20 % d'acide trichloracétique.....	1	1	1	1
Eau distillée.....	0	1	2	3
—	—	—	—	—
Dilution finale du sérum.....	1/2	1/3	1/4	1/5

L'oxydation a été faite sur 10 cm³, 15 cm³, 20 cm³, 25 cm³ de filtrat à l'aide de 3 cm³ d'acide azotique fumant et 1 cm³ d'acide perchlorique.

Que le filtrat ait été évaporé ou non avant addition des acides, les résultats trouvés sont identiques, mais nous signalons qu'une évaporation préliminaire trop poussée allant jusqu'à début de charbonnement du résidu, peut occasionner des pertes de soufre.

Les résidus d'oxydations sont repris comme il est indiqué page 87 et les déterminations des densités optiques pratiquées en double selon les proportions : 5 cm³ de liquide à doser pour 1 cm³ de solution « gélatine-chlorure de baryum n° II ». Les valeurs trouvées sont identiques pour un même sérum, quel que soit le mode de désalbumination.

Valeurs des densités optiques (déduction faite de la densité optique du témoin d'oxydation sans soufre)
suivant le mode de désalbumination

Sérums	1	2	3	4
A	38-38	40-40	41-41	40-40
B	48-48	48-48	(n'a pas été fait)	48-48

Nous avons donc adopté le mode de désalbumination (1), à volumes égaux de sérum et de solution trichloracétique à 20 %, qui est le plus simple et dilue le moins le sérum, ce qui présente un réel intérêt pour le dosage des sulfates.

3) Du dosage des sulfates dans le sang

BROWINSKI dit que GRUBER, le premier en 1894, démontra la présence de sulfates dans le sérum du sang de cheval et que son élève ROSENHEIM en trouva sous forme dialysable 18 à 25 mgr. d' H^2SO^4 pour 100 cm^3 (soit 6 à 8 mgr. de S). S. de BOER, en 1918, après ultra-filtration du sérum de cheval et dosage par sédimentation du SO^4Ba , trouva la même teneur. BROWINSKI, en 1924, après défécation trichloracétique, trouva 9 mgr. 55 à 12 mgr. de S, mais ses résultats sont critiquables, vu le mode de dosage employé. Peut-être même dose-t-il le soufre oxydé total et non le soufre des sulfates, puisqu'il ne trouve pas de sulfoconjugués.

Jusqu'en 1926, pour le sang humain, les auteurs donnent seulement le chiffre du soufre oxydé total. Les premiers, DENIS et Mlle REED donnent, comme chiffres normaux des sulfates libres : 0 mgr. 4 à 1 mgr., 1 pour 100 cm^3 de sang. Leurs résultats ont été confirmés par LOEB et BENEDICT (54) en 1927 (le soufre des sulfates pour 100 cm^3 de sérum est de 0 mgr. 64 à 1 mgr. 6 pour les cas normaux et peut atteindre jusqu'à 16 mgr. chez les néphrétiques); puis par E. G. WAKEFIELD (1 mgr. 23 de S pour 100 cm^3 sérum). Les résultats de ce dernier, il est vrai, peuvent être critiquables, vu la méthode employée pour de si faibles doses de sulfates à doser.

MM. A. LESURE et A. DUNEZ (1929) trouvent sensiblement le même chiffre de S sulfates et de S oxydé total (3 mgr. 5 à 7 mgr. 5 pour 100 cm^3 sérum normal), mais leur mode de désalbumination à chaud par l'acide acétique hydrolyse peut-être des sulfoconjugués.

Existe-t-il des sulfates libres dans le sang? — L'action des différents réactifs pendant la désalbumination pouvant peut-être scinder des composés très labiles pour libérer des ions

SO⁴, nous avons cherché à démontrer la présence des sulfates dans le sérum humain par dialyse. Pour arriver à faire passer tous les sulfates du sérum dans le liquide de dialyse, il faudrait renouveler fréquemment ou continuellement l'eau distillée du dialyseur. Une telle dialyse durerait plusieurs jours (HEUBNER et MEYER-BISCH (61) ont mis quatorze jours pour dialyser complètement 75 cm³ de sérum jusqu'à disparition de réaction positive pour l'ion Cl), et elle ne présenterait d'intérêt que pour le dosage des sulfates. Pour une simple recherche, une dialyse dite « d'équilibre » est suffisante (1).

Nous avons donc pratiqué plusieurs dialyses d'équilibre sur des mélanges de sérums normaux en utilisant des sacs de collodion.

Pour doser le soufre des sulfates dans le liquide de dialyse et celui des sulfates libres du sang, nous nous sommes adressés à la méthode néphélométrique en opérant en milieu trichloracétique. L'examen du tableau ci-après montre que la méthode ne peut qu'y gagner en sensibilité, les densités optiques étant légèrement plus élevées qu'en milieu à pH 3, et l'acide trichloracétique ne présentant pas un pouvoir dissolvant aussi marqué que l'acide perchlorique vis-à-vis du sulfate de baryte. En outre, il est à remarquer qu'en acidité trichloracétique, les valeurs des densités optiques obtenues ne dépendent presque pas du titre de cette acidité, si elle est inférieure à 10 %. Dernier avantage, enfin, de ce mode précipitation en milieu très acide : il permet d'éviter la précipitation possible des autres sels de baryum.

Valeurs des Densités optiques suivant la teneur en mgr de S par cm ³ de solution				
Milieu trichloracétique à	0,005	0,010	0,015	0,020
0 % (sol. aq. de pH 2,5).....	9	19	29	39
5 %	11	22	34	45
10 %	12	24	35	47

(1) Le sac de dialyse, renfermant une quantité connue et fixe d'eau distillée, est plongé dans un volume déterminé de sérum à dialyser. Au bout d'un certain temps, les échanges à travers la paroi s'arrêtent. Il s'établit donc un équilibre, d'où le nom de dialyse « d'équilibre ».

Dialyses : Nous avons mesuré :

dans le verre (1)	100 cm ³ eau distillée + 4 cm ³ sol. de S à 0 mgr. 25 par cm ³	teneur finale en S par cm ³ 0 mgr. 00877.
dans le verre (2)	100 cm ³ sérum.	
dans le verre (3)	100 cm ³ sérum + 4 cm ³ sol. de S à 0 mgr. 25 par cm ³	surcharge en S. par cm ³ 0 mgr, 00877

Chaque sac de dialyse renfermait 10 cm³ eau distillée. Les verres furent laissés trois jours à la glacière et on eut soin d'agiter de temps à autre pour renouveler les surfaces de contact. Le sac du verre (1) renfermait finalement 9 cm³ 1 de liquide limpide; le sac (2) 7 cm³ 8 de liquide limpide, le sérum du verre ne présentant aucun signe d'altération; le sac (3), 6 cm³ 8 de liquide louche, le sérum présentant une odeur légèrement putride.

Les déterminations des densités optiques furent pratiquées sur les liquides de dialyse additionnés de volume égal d'acide trichloracétique à 20 % et filtrés (cette filtration était nécessaire pour le liquide louche du sac 3).

Les densités optiques trouvées furent pour le filtrat (1).....	9
— — — filtrat (2).....	15
— — — filtrat (3).....	25

soit, tout calcul fait, une teneur en mgr. de S par cm³ pour :

le liquide (1).....	0 mgr. 0082
le liquide (2).....	0 mgr. 0136
le liquide (3).....	0 mgr. 0227

Le sulfate ajouté à (2) fut donc sensiblement retrouvé dans (3), puisque leur différence nous donne 0 mgr. 0091 au lieu de 0 mgr. 0087.

On peut donc conclure, des dialyses précédentes, à la présence de sulfates libres dans le sérum. D'autres dialyses, pratiquées toujours sur des mélanges de sérums normaux, nous ont donné des chiffres variant de 0 mgr. 010 à 0 mgr. 015.

Dosages des sulfates dans le sang. — Le fait qu'il existe des sulfates libres dans le sérum et que la lecture néphélométrique

peut être pratiquée en milieu trichloracétique, nous a amenés tout naturellement à doser ces sulfates directement dans le filtrat :

Sérum, sang 1/2 ou globules 1/3..... 1 volume
Solution à 20 % d'acide trichloracétique..... 1 —

La teneur trouvée devrait être, si le procédé de défécation respecte la structure des composés, sensiblement égale à celle du liquide du sac de dialyse, pour un même sérum (correction faite, dans ce dernier cas, de la dilution).

C'est ce qui résulte de l'examen du tableau ci-dessous :

Quant aux erreurs pouvant entacher les densités optiques par suite des différences d'acidité entre les filtrats et le liquide de dialyse à 10 % d'acide trichloracétique, elle sont nulles comme le montre le tableau de la page 94, la diminution d'acidité due à la défécation étant seulement de 15 % environ.

Valeurs des Densités optiques obtenues avec le				
Sérums	filtrat trichl. au demi	liquide du sac de dialyse au demi	Après correction	filtrat trichl. au demi du sérum après dialyse
(1)	14	12	13,2	10
(2)	20	18	19,8	
(3)	17	15	16,5	

Pour démontrer que dans la défécation trichloracétique du sérum il y a bien égale répartition des sulfates entre le filtrat et le coagulum, nous avons effectué les déterminations de densités optiques que donnent, avec 1 cm³ de solution « gélatine-chlorure de baryum n° II », 5 cm³ des liquides ci-après :

Densités optiques trouvées	
(1) Filtrat trichloracétique au demi d'un sérum.	10-10
(2) Filtrat trichloracétique de ce même sérum additionné au préalable de 0 mgr. 04 de S sulfates par cm ³ de sérum.....	44-44
(3) Filtrat (1) additionné ensuite de 0 mgr. 02 de S sulfates par cm ³ de filtrat.....	44-43

Le fait de trouver la même teneur en S, que l'on ait ajouté une quantité connue de sulfates au sérum avant défécation, ou une quantité deux fois plus faible à un même volume de filtrat trichloracétique de ce sérum, prouve bien que la teneur du filtrat en sulfates est moitié de celle du sérum.

On peut donc conclure que *le dosage des sulfates fait directement, par la méthode néphélométrique, sur le filtrat trichloracétique au demi est correct.*

Les valeurs normales sont de 0 mgr. 008 à 0 mgr. 022 de S par cm³ de sérum.

Le filtrat trichloracétique, après neutralisation, ne nous a jamais donné de précipité par la benzidine et on ne saurait d'ailleurs en être surpris vu sa faible teneur en sulfates.

4) Du dosage du soufre oxydé total dans le sang

Si on a pu isoler des sulfoconjugués dans les urines (BAUMANN), leur présence dans le sang n'est qu'une hypothèse vraisemblable qui, pour certains auteurs, paraît confirmée parce que, après hydrolyse chlorhydrique du filtrat de désalbumination du sérum, ils trouvent une teneur en sulfates supérieure à la teneur initiale.

Nous avons cherché à démontrer l'existence des sulfoconjugués dans le sérum, tout d'abord par électrolyse de ce sérum ou du filtrat trichloracétique au demi correspondant. Mais, soit qu'il n'y en ait pas ou trop peu, soit que dans ces conditions ils aient une trop grande stabilité, nos essais ont été sans résultat positif, la teneur trouvée de sulfates étant sensiblement la même avant et après passage du courant, quelle qu'en soit la durée (1).

Quant à l'hydrolyse par l'acide chlorhydrique à l'ébullition, elle ne nous a pas donné des résultats toujours probants.

(1) Nous avons utilisé le courant continu ou alternatif de faible ampérage, 0 amp. 15 environ, en introduisant dans notre circuit une lampe résistance, nos électrodes étant constituées par deux charbons de lampe à arc. Quand nous soumettons du sérum à l'électrolyse pendant plus de dix minutes, nous le refroidissons pour éviter sa coagulation.

Cependant, nous avons fréquemment trouvé après hydrolyse une augmentation de la teneur en sulfates, augmentation qui ne peut provenir des erreurs de la méthode de dosage, Quelle que soit, pour 10 cm³ de filtrat trichloracétique au demi, la quantité d'acide chlorhydrique ajoutée (1 cm³ HCl N à 1 cm³ acide pur), si on a soin ensuite de neutraliser comme nous le faisons après oxydation pour le dosage du soufre total (page 87), la teneur trouvée en sulfates ne varie pas, que l'ébullition dure 5 à 60 minutes. L'ébullition sans addition d'acide chlorhydrique donne un chiffre sensiblement identique, et il se peut que l'acide trichloracétique joue le même rôle hydrolysant que HCl.

Nous avons adopté, pour plus de sécurité, l'hydrolyse chlorhydrique, en employant 5 cm³ HCl N pour 10 cm³ filtrat.

TECHNIQUE PROPOSÉE POUR LE DOSAGE DU SOUFRE SANGUIN

a) Dosage du soufre non protéique

1° Désalbumination.

Mesurer :

Sérum, sang 1/2 ou globules 1/3.....	1 vol.
Solution d'acide trichloracétique à 20 %..	1 —

Filtrer sur papier sans cendres.

2° Dosage du soufre des sulfates.

Neutraliser (1) comme suit le filtrat dans un ballon jaugé de 10 cm³ :

Soude 2N mesuré à la pipette.....	1 cm ³
Filtrat trichloracétique q.s.p.....	10 cm ³

(1) Nous effectuons cette neutralisation et dilution pour nous trouver dans les mêmes conditions d'acidité et de dilution que pour le dosage du S oxydé total et du soufre total.

Pratiquer en double le dosage des sulfates par notre méthode néphélémétrique en ajoutant 1 cm³ de solution « gélatine-chlorure de baryum II » (p. 21 et 55) à 5 cm³ de filtrat neutralisé précédemment. Préparer en même temps la gamme ci-après à partir de la solution mère à 0 mgr. 05 de S par cm³ :

H ² SO ⁴ N/10.....	31 cm ³ 25
Eau distillée q.s.p.....	1.000 cm ³

Teneur en mgr S S par cm ³	Cc de solution à 0 gr. 05 de S par cc ³	Eau distillée	cc. de sol. gél. Cl ₂ Ba II"	Valeur des densités optiques théoriques
0,005.....	1	9	2	10 à 11
0,010.....	2	8	2	20 à 21
0,015.....	3	7	2	30 à 32
0,020.....	4	6	2	40 à 42
0,025.....	5	5	2	50 à 52
témoin	0	10	2	0

Déterminer les valeurs des densités optiques au photomètre de VERNES, BRICQ et YVON, et en déduire la teneur en S. du filtrat, puis du sérum.

3° Dosage du soufre oxydé total.

Porter à l'ébullition dans un erlenmeyer de 125 cm³ muni d'un réfrigérant à reflux, durant quinze minutes :

Filtrat trichloracétique.....	10 cm ³
HCl N.....	5 cm ³

Ne faire fonctionner le réfrigérant qu'après réduction du liquide à moitié. Après refroidissement, transvaser dans une fiole jaugée de 10 cm³ bouchée émeri. Laver l'erlenmeyer avec 2 à 3 cm³ soude 2N, puis avec de l'eau distillée et ajouter les liquides de lavage dans la fiole jaugée jusqu'au trait. Déterminer l'acidité du liquide ainsi obtenu sur 2 cm³ en présence de bleu de bromophénol à l'aide de soude N/10. Aux 8 cm³ restant dans le flacon ajouter, diminuée de 0 cm³ 1, la quantité de soude N nécessaire pour neutraliser. Compléter à nouveau au trait. S'assurer que le pH du liquide ainsi préparé est inférieur à 2,8 à 3, à l'aide du bleu de thymol et du bleu de bromophénol. Effectuer ensuite le dosage du soufre oxydé total, en

même temps et dans les mêmes conditions que le dosage du soufre des sulfates.

4° Dosage du soufre total non protéique.

Mesurer dans un ballon de KJELDAHL en PYREX de 60 cm³, renfermant une bille de verre :

Filtrat trichloracétique	10 cc.
Acide nitrique fumant (D=1,49).....	3 cc.
Acide perchlorique (D=1,615).....	1 cc.

Porter à l'ébullition jusqu'à dessiccation presque complète, Après refroidissement, ajouter 1 cm³ de soude N et 2 à 3 cm³ d'eau distillée. Transvaser dans une fiole jaugée de 10 cm³ bouchée émeri, et compléter au trait avec les eaux de lavage du ballon de KJELDAHL. Déterminer l'acidité, neutraliser et doser le S total comme le soufre oxydé total.

On remarquera que finalement les 5 cm³ des solutions dans lesquelles on a à doser les sulfates correspondent, dans tous les cas, à 2 cm³ de sérum, dont on aura la teneur en mgr. de S par cm³ (S sulfates, S oxydé total, S total), en multipliant par 2,5 le résultat trouvé pour 1 cm³ de solution.

40 cm³ de sang fournissant, après centrifugation, plus de 22 cm³ de sérum, sont suffisants pour permettre de faire en double tous les dosages du soufre sanguin.

b) Dosage du soufre total

La teneur en soufre étant ici beaucoup plus élevée, on pratique l'oxydation, comme ci-dessus, sur 0 cm³ 5 de sérum seulement. Il est bon de laisser en contact deux ou trois minutes avant de chauffer, et il faut surveiller la destruction pour éviter toute perte par suite d'une production possible de mousse. La destruction est complète en quinze minutes. Le résultat trouvé par cm³ de solution à doser doit ici être multiplié par 25 pour avoir la teneur en mgr. de S par cm³ de sérum.

La mesure de $0\text{ cm}^3\ 5$ de sérum nécessite l'emploi de pipettes d'usage peu courant (pipette de Cornec). Aussi généralement on détruit 1 cm^3 . Dans ce cas, il est préférable de compléter à 25 cm^3 au lieu de 20, afin de pouvoir déterminer l'acidité sur une prise d'essai de 5 cm^3 facile à mesurer. Diminuer alors de $0\text{ cm}^3\ 25$ la quantité théorique de soude N à ajouter. Quant au résultat trouvé, il doit être ici multiplié par 31,25.

Remarque importante.

Ne pas oublier que, par densité optique, on comprend les différences de densités optiques de la solution à doser et d'une solution témoin. Il est donc nécessaire de faire une fois pour toutes les déterminations des densités optiques :

1° de l'acide trichloracétique à 10 % neutralisé par la soude;

2° Du produit d'oxydation de 10 cm^3 de cet acide par le mélange oxydant et neutralisé comme pour le dosage du soufre total.

Si on ne dispose pas d'un photomètre, les précipités peuvent être comparés à l'œil en tournant le dos à la lumière et en appliquant les tubes contre un papier blanc à caractères d'imprimerie noirs de plus en plus fins, mais l'erreur peut être appréciable. Peut-être pourrait-on aussi utiliser le colorimètre-néphélomètre de BAUDOUIN et BÉNARD.

Quant à la méthode benzidinique, elle ne peut être employée que pour le dosage du soufre total du sérum et du soufre total non protéinique et il faut alors opérer au moins sur 25 cm^3 filtrat trichloracétique ou 1 cm^3 sérum pour obtenir des résultats corrects (V. technique p. 68).

CHAPITRE VIII

TAUX DU SOUFRE SANGUIN

Sulfates.

Dans le sérum de cheval, S. DE BOER, de même que ROSENHEIM, ont trouvé 6 à 8 mgr. de S sulfates, et BROWINSKI 9,55 à 12 mgr. pour 100 cm³ de sérum.

Dans le sérum humain, il en existerait, d'après HEUBNER et MEYER BISCH (60), 1,2 à 2 mgr. par 100 cm³, « tout chiffre supérieur provenant d'une mauvaise technique ». DENIS et Mlle REED, KAHN et POSTMONTIER (40), LOEB et BENEDICT, WAKEFIELD donnent des chiffres variant de 0 mgr. 4 à 1 mgr. 6, et MM. A. LESURE et A. DUNEZ 3,5 à 7 mgr. 5 pour 100 cm³ de sérum.

Nous avons effectué nos dosages uniquement sur des mélanges de très nombreux sérums humains considérés comme normaux et nous avons trouvé une teneur moyenne de 0 mgr. 8 à 2 mgr. 2 de S sulfates pour 100 cm³ sérum.

Chez les néphrétiques et les albuminuriques, les auteurs trouvent une augmentation très marquée des sulfates : jusqu'à 16 mgr. par 100 cm³ de sérum, d'après LOEB et BENEDICT.

D'autre part, d'après W. DENIS, G.-R. HERMANN et L. REED (23), les sulfates sont normalement limités au plasma, tandis que dans les néphrites avec rétention de sulfates, ces derniers augmentent plus vite dans le sang que dans le plasma, ce qui indiquerait une diffusion avec rétention dans les globules rouges. En outre, il n'y a pas plus de relation directe apparente entre les rétentions de l'azote non protéique et des

sulfates, qu'entre ces derniers et le soufre neutre ou le chlore.

Notons en passant que d'après F. HAUROWITZ (32) la concentration en sulfates du liquide céphalo-rachidien est constante et égale à 1 mgr. 10 par 100 cm³, légèrement inférieure à celle du sang.

Soufre oxydé total.

DENIS et Mlle REED, A.-E. KOELER (43) trouvent 1,5 à 3 mgr. de soufre oxydé total pour 100 cm³ de sérum. MM. A. LESURE et A. DUNEZ, nous l'avons vu, trouvent sensiblement le même chiffre que pour le soufre des sulfates.

Pour notre part, nous trouvons tantôt un chiffre de soufre oxydé total très voisin, si ce n'est identique, à celui du soufre des sulfates, tantôt un chiffre légèrement plus élevé : 2 à 4 mgr. de S.

D'après DENIS et Mlle REED, les globules seraient plus riches en sulfoconjugués que le plasma (il en serait de même pour le soufre neutre).

Soufre total non protéique.

DENIS et Mlle REED, A.-E. KOELHER trouvent 4 à 5,7 mgr. de soufre total non protéique pour 100 cm³ de sérum. MM. A. LESURE et A. DUNEZ considèrent comme normaux les chiffres compris entre 7 et 12 mgr.

Nous trouvons comme doses normales 3,2 à 5,6 mgr. de S.

	Soufre oxydé total	SO
Valeur du rapport		
	Soufre total non protéique	ST

La valeur normale serait de 45 à 51 % pour DENIS et Mlle REED, 57 % pour A.-E. KOELHER et de 52 à 65 % pour MM. A. LESURE et A. DUNEZ.

Nous trouvons un rapport généralement plus élevé et voisin de 80 %.

DENIS et Mlle REED donnent le tableau ci-dessous pour la teneur en S du sérum humain normal :

	Sulfates	Sulfo- conjugués	Soufre oxydé total	Soufre neutre	Soufre total non protéique
Teneur en mg de S pour 100 cc sérum.	0,4 à 1,1	0,9 à 1,5	1,9 à 2	2,2 à 2,5	5,7 à 4,5
Pourcent du S total.	9 à 25	19 à 41	45 à 51	55 à 59	100

A. E. KOELHER qui emploie la méthode de dosage des auteurs précédents donne les valeurs ci-après pour 100 cm³ (en mgr.)

	Soufre oxydé total	Soufre neutre
Plasma.....	1,5 à 3	0,5 à 3
Globules...	Traces à 2,5	5 à 9, soit 6 à 7 fois plus que dans le plasma.
Rapport	$\frac{\text{S. O. T. globules}}{\text{S. O. T. Plasma}} = 7,5$	

Il signale en outre une élévation du soufre neutre dans plusieurs cas de maladie d'Addison :

1,2 à 18 mgr. dans les globules
3,5 à 5 mgr. dans le plasma

et surtout différentes variations dans les troubles thyroïdiens, mais il ne trouve pas de rapport direct entre l'abaissement du taux de soufre et de métabolisme, les faibles doses de soufre accompagnant généralement un épuisement, un amaigrissement ou une dénutrition.

Quant à JENSEN W.-H., et A.-M. LÖEW (35), ils donnent comme chiffre normal du soufre total dans le sang humain total : 117 à 166,6 mgr. de S par 100 cm³, soit une moyenne de 141,5.

Nous avons trouvé pour un mélange de sérums normaux, une teneur de 100 mgr. de S par 100 cm³.

RESUME ET CONCLUSIONS

Dans la première partie du travail, nous avons exposé les différentes méthodes préconisées pour doser l'ion SO^4 .

Dans la deuxième partie, nous avons étudié tout d'abord la méthode néphélométrique au sulfate de baryte de DENIS et Mlle REED. Nous l'avons modifiée en la rendant :

1° *plus sensible*, la même quantité de soufre étant finalement précipitée dans un volume moindre;

2° *plus exacte*, par l'emploi du photomètre de Vernes, Bricq et Yvon, pour mesurer l'opacité du précipité.

Nous avons montré que les densités optiques des précipités de sulfate de baryte sont proportionnelles aux teneurs en soufre, et nous avons déterminé pour quelles teneurs limites en mgr. de S par cm^3 , on peut employer correctement notre méthode.

Nous avons aussi étudié tous les temps de la méthode benzidinique, en cherchant à éliminer le plus possible, les erreurs dues à l'adsorption de chlorhydrate de benzidine par le sulfate de benzidine.

Dans la troisième partie, nous avons exposé les techniques de dosage du soufre sanguin des différents auteurs. Puis, après étude :

1° Des meilleurs modes d'oxydation, de désalbumination et d'hydrolyse;

2° De l'existence des diverses formes du soufre sanguin,

nous avons appliqué notre méthode néphélométrique au dosage du soufre dans le sang, et nous avons montré que :

Le dosage des sulfates dans le filtrat trichloracétique au demi est correct;

La présence des sulfoconjugués ne semble pas constante;

L'oxydation nitroperchlorique est le procédé de choix à utiliser.

Finalement, nous rapportons les résultats trouvés pour les différentes formes de soufre sanguin par les auteurs, ainsi que les nôtres.

Vu, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
GRIMBERT

Vu :
Le Doyen de la Faculté,
RADAIS.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLETY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ASZÓDI ZOLTAN, *Biochem. Zeitsch.*, T. 212, p. 102 et 158 (1929).
2. ATKINSON (H.), *Analyst*, T. 50, p. 590-600 (1925).
3. BAHRDT (A.), *Zeitsch. Anal. Chem.*, T. 70, p. 109-119 (1927).
4. BAUMANN (E.), *Ber. der Deut. Gesell.*, T. 9, p. 54, 1879, 1715 (1876).
T. 11, p. 1907 (1878).
5. BAUZIL (L.), *J. Pharm. et Chim.*, T. 17, p. 189 (1918).
6. BAUDOUIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, T. 10, p. 977 (1928).
7. BENEDICT, *J. of Biol. Chem.*, T. 67, p. 267 (1926).
8. BERTRAND (G.) et SILBERSTEIN (L.), *Bull. Soc. Chim. de France*, T. 41, p. 950 (1927).
9. BIEHRINGER et BORSUM (W.), *Chem. Zeit.*, T. 30, p. 721 (1906).
10. BOER (S. de), *J. of Physiologie*, T. 51, p. 211 (1917).
11. BOIVIN (A.), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, T. 11, p. 1331 (1929).
12. BOUTARIC (A.) et PERREAU (G.), *Rev. Gén. des Coll.*, T. 6, p. 113-117 (1928).
13. BRIWUL (A. A.), *Zeitsch. Anorg. Chem.*, T. 156, p. 210 (1926).
14. BROWINSKI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, T. 6, p. 352 (1924).
15. CHATRON (M.), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, T. 11, p. 602 (1929).
16. COLLINS (W.) et FOSTER (M.), *Ind. et Eng. Chem.*, T. 15, p. 1078-1080 (1923).
17. CORDIER (M.), *J. Pharm. et Chim.*, T. 17, p. 193 (1918).
18. CRISTOL (P.), Etude sur la désalbumination du sang et des humeurs, en vue du dosage de l'azote totale non protéique et son exploration en physiopathologie. (Maloine, éd.) (1926).
19. CRISTOL (P.), *Bul. Soc. Chim. Biol.*, T. 11, p. 92 (1929).
20. DENIS (W.), *J. of Biol. Chem.*, T. 49, p. 311-315 (1921).
21. DENIS (W.) et Mlle REED (L.), *J. of Biol. Chem.*, T. 71, p. 191 (1926).
22. DENIS (W.) et Mlle REED (L.), *J. of Biol. Chem.*, T. 73, p. 623 (1927).
23. DENIS (W.), HERMANN (G. R.) et Mlle REED (L.), *Arch. Int. Med.*, T. 41, p. 385 (1928).
24. FISKE, *J. of Biol. Chem.*, T. 47, p. 59 (1921).
25. FRITZ ULMANN, *Enzyklopädie der Technischen Chemie Berlin*, T. 2, p. 316 (1915).
26. GAUVIN (R.) et SKARZINSZI (V.), *Bull. Soc. Chim. France*, T. 13, p. 1921 (1913).
27. HAASE (L. W.), *Zeitsch. Angewan. Chem.*, T. 40, p. 595-99 (1927).
28. HAHN (F. L.), *Zeitsch. Anorg. Chem.*, T. 126, p. 257 (1923).
29. HAMBURGER, *Biochem. Zeitsch.*, T. 77, p. 168-88 (1916).
30. HAMBURGER, *Zeitsch. Für Phys. Chem.*, T. 100, p. 221 (1917).
31. HAMUS (M.), *Rev. Chim. et Ind.*, n° sp. de mai (1927).
32. HAUROWITZ (F.), *Zeits. Physiol. Chem.*, T. 128, p. 290 (1928).

33. HINGLAIS (M.), *Bul. Sc. Pharm.*, T. 33, p. 625 (1926).
34. HUBBARD (R. S.), *J. of. Biol. Chem.*, T. 74, proc. V (1927).
35. JANSEN (W. H.) et LOEW (A. M.), *Deutsch. Arch. Klin. Med.*, T. 54, p. 195-220 (1927).
36. JELLINECK (H.) et CZERWINSKI (J.), *Zeitsch. Anorg. chem.*, T. 130, p. 253 (1923).
37. JELLINECK (H.) et EMS (H.), *Zeitsch. Anorg. chem.*, T. 124, p. 185-202 (1922).
38. JENSEN (H. R.), *Analyst.*, T. 53, p. 136-38 (1928).
39. KAHN (R. S.) et LEIBOFF (S. L.), *J. of. Biol. Chem.*, T. 80, p. 623 (1928).
40. KAHN et POSMONTIER, *J. Lab. et clin. Med.*, T. 10, p. 317 (1925).
41. KAMBAYASHI (Y.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 215, p. 402-05 (1929).
42. KLINKE, *Biochem. Zeitsch.*, T. 154, p. 171-75 (1924).
43. KOELHER (Alfred E.), *J. of. Biol. Chem.*, T. 78, p. IXX (1928).
44. KOLTHOFF (J.) et VAN CITTERT (J. C.), *Bull. Soc. Chim. France*, T. 36, p. 898-99 (1924).
45. KONARSKY, *Biochem. Zeitsch.*, T. 187, p. 398 (1927).
46. KÖSZEGI (M. D.), *Zeitsch. Anal. Chem.*, T. 77, p. 203-09 (1929).
47. KRUY (VAN'T), *Zeitsch. Anal. Chem.*, T. 49, p. 393 (1910).
48. KONRAD LANG, *Biochem. Zeitsch.*, T. 213, p. 469 (1929).
49. LE GUYON (Robert F.), *Bull. Soc. Ch. de France*, T. 41, p. 1387 (1927).
50. LEMATTE (L.), BOINOT (G.) et KAHANE, *J. Pharm. et Chim.*, T. 5, p. 325 et 361 (1927).
51. LESURE (A.) et DUNEZ (A.), *Bul. Soc. Chim. Biol.*, T. 10, p. 879 (1928).
52. LESURE (A.) et DUNEZ (A.), *Bul. Soc. Chim. Biol.*, T. 11, p. 600 (1929).
53. LEULIER (A.) et FOUILLOUZE, *Bul. Sc. Pharm.*, T. 32, p. 129 (1925).
54. LOEB (R. F.) et BENEDICT (E. M.), *J. Clin. Investigation*, T. 4, p. 33 (1925).
55. LOEPER (M.), *Progrès Médical « La Thiémie Normale et Pathologique »*, n° 46 du 13 nov. 1926.
56. LOEPER (M.), OLLIVIER (J.) et TONNET, *C. R. Soc. Biol.* (1925).
57. MAXWELL BISCHOFF et BLATHERWICK, *J. of. Biol. Chem.*, T. 72, p. 51 (1927).
58. MAY (Raoul M.), *Bull. Soc. Chim. Biol.*, T. 9, p. 970 (1927).
59. MEYER-BISCH, *Biochem. Zeitsch.*, T. 150, p. 23-35 (1924).
60. MEYER-BISCH et HEUBNER (W.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 122, p. 120-27 (1921).
61. MEYER-BISCH et HEUBNER (W.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 176, p. 184-88 (1926).
62. MINDALEW (Z.), *Zeitsch. Anal. Chem.*, T. 75, p. 392 (1928).
63. MODRAKOWSKI, *Zeitsch. Phys. Chem.*, T. 38, p. 562 (1903).
64. MONIKOVSKI, Méthodes volumétriques de dosages de l'acide sulfurique combiné à l'état de sulfate de benzidine (Thèse Fac. Nancy) (1923).

65. MORGULIS (S.), *J. of Biol. Chem.*, T. 77, p. 627 (1928).
66. MYTTENAERE (M. DE), *Bul. de l'Acad. Royale de Médecine de Belgique*, T. 13 (5) (1923).
67. NEUBERG (C.) et KURONO (K.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 140, p. 295 (1923).
68. NEUBERG (C.) et LINHARDT (K.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 142, p. 191 (1923).
69. NEUBERG (C.) et SIMON (E.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 156, p. 365 (1925).
70. NEUBERG (C.) et WAGNER (G.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 161, p. 492 (1925).
71. NOGUCHI I.J., *Biochem. Zeitsch.*, T. 143, p. 186 (1923); T. 144, p. 139 (1924).
72. NYDEGGER (O.), *Zeitsch. Anal. Chem.*, T. 76, p. 292 (1929).
73. POHORECKA-LESLEZ, (Mme), *Bul. Soc. Chim. Biol.*, T. 9, p. 263 (1927).
74. RAPER (Henry Stanley), *Biochem. Journal*, T. 21, p. 89 (1927).
75. RASCHIG, *Zeitsch. Angewan. Chem.*, T. 16, p. 617 et 818 (1903).
76. RASCHIG, *Zeitsch. Angewan. Chem.*, T. 40, p. 864 (1927).
77. REHBERG (P. B.), *Biochem. Jour.*, T. 20, p. 483 (1926).
78. ROCHE, *Bul. Soc. Chim. Biol.*, T. 10, p. 1061 (1928).
79. ROSENFELD, *Biochem. Zeitsch.*, T. 157, p. 434 (1925).
80. ROTH, *Zeitsch. Angewan. Chem.*, T. 39, p. 1599 (1926).
81. ROSENHEIM et DRUMMOND, *Biochem. Jour.*, T. 8, p. 143-45 (1914-15).
82. SALKOWSKI (E.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 9, p. 1595 (1876); T. 10, p. 842 (1877).
83. SCHAEF (F.), *Ber. der Deut. Gesell.*, T. 209, p. 79 (1925).
84. SCHOCH (E. P.), *J. of Ind. et Eng. Chem.*, T. 19, p. 112-15 (1927).
85. SLYKE (D. D. VAN) HILLER (A.) et BERTHEISEN (K. C.), *J. of Biol. Chem.*, T. 74, p. 659-75 (1927).
86. STADIE (W. C.) et ROSS (C.), *J. of Biol. Chem.*, T. 65, p. 735-54 (1925).
87. STREBINGER (R.) et L. VON ZORNBERG, *Zeitsch. Anal. Chem.* T. 79, p. 1 (1929).
88. TALENTI (M.), *Gior. Chim. ind. appl.*, T. 18, p. 611 (1926).
89. TESTONI (G.), *Ann. Clinica Applicata*, T. 18, p. 408-14 (1928).
90. VALER (J.), *Biochem. Zeitsch.*, T. 190, p. 444 (1927).
91. VERNES (Arthur), Fascicule 2 des travaux et publications de l'Institut prophylactique. (A. Maloine, éd.) (1923.)
92. VLASTIMIL et M. MATULA, *Chem. Zeitung*, T. 50, p. 486-88 (1926).
93. WAKEFIELD (E. G.), *Jour. of Biol. Chem.*, T. 81, p. 713-21 (1929).
94. WANDENBULCKE (H. F.), *C. R. Acad. Sc.*, T. 180, p. 515 (1925).
95. WEINMANN (Fritz), *Biochem. Zeitsch.*, T. 205, p. 214 (1929).
96. WHITTE (H. L.), *Am. Jour. Phys.*, T. 65, p. 537 (1924).
97. WOLF MULLER, *Ber. der Deut. Chem. Ges.*, T. 35, p. 587-89 (1902).
98. WURTZ, *Dictionnaire de Chimie pure et appliquée* (Hachette, éd.).
99. YAMAZAKI JUNZO, *Bul. Chem. Soc. Japon*, T. 3, p. 173-80 (1928).
100. YOSHIMATSU (S.), *Tohoku J. Exp. Med.*, T. 7, p. 119 (1926).
101. ZIMMERLUND (G.) et SVANDBERG (O.), *Bull. Soc. Chim. France*, T. 34, p. 1139. (1923).

Saint-Cloud. — Imp GIRAULT 3, place de l'Eglise. — Tél. 369
